ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

ANNEE : 1981 THESE : 116

LES ENZYMES DE LA DIGESTION INTESTINALE DU POISSON :

ETUDE PARTICULIERE CHEZ LE LOUP OU BAR :

DICENTRARCHUS LABRAX L.

THESE

Pour le Doctorat Vétérinaire
(Diplôme d'Etat)
Présentée et soutenue publiquement en 1981

par

Bruno, René, Paul BRIGAUDEAU

Né le 27 Février 1955 à SAIGON (Sud-Vietnam)

Membres du Jury

Président : ..... Monsieur BESSOU
Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse

Assesseurs : ..... Monsieur RUCKEBUSCH
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Monsieur TOUTAIN
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

ANNEE : 1981 THESE : 116

LES ENZYMES DE LA DIGESTION INTESTINALE DU POISSON :

ETUDE PARTICULIERE CHEZ LE LOUP OU BAR :

DICENTRARCHUS LABRAX L.

THESE

Pour le Doctorat Vétérinaire
(Diplôme d'Etat)
Présentée et soutenue publiquement en 1981

par

Bruno, René, Paul BRIGAUDEAU

Né le 27 Février 1955 à SAIGON (Sud-Vietnam)

Membres du Jury

Président : ..... Monsieur BESSOU
Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse

Assesseurs : ..... Monsieur RUCKEBUSCH
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Monsieur TOUTAIN
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

MINISTERE DE L'AGRICULTURE

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur	M. LAUTIE
Directeur honoraire	MM. FLORIO
Professeurs honoraires	MM. BRIZARD BERTHELON SAURAT

PERSONNEL ENSEIGNANT

CHAIRE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE

Professeur titulaire	M. GODFRAIN
Professeur sans chaire	Mme BURGAT-SACAZE

Pharmacie et Toxicologie

CHAIRE DE PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES

Professeur titulaire	M. RICO
Professeur sans chaire	M. BRAUN
Maître Assistant	M. BENARD

Physique Biologique et Médicale
Chimie Biologique et Médicale

CHAIRE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES

Professeur titulaire	M. PAVAUX
Maître Assistant	M. LIGNEREUX
Maître Assistant	M. SAUTET

Anatomie Descriptive - Extérieur - Anatomie Appliquée - Tératologie

CHAIRE DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE

Professeur titulaire	M. RUCKEBUSCH
Professeur sans chaire	M. FARGEAS
Maître Assistant Agrégé	M. TOUTAIN

Physiologie - Pharmacodynamie et Thérapeutique

CHAIRE D'HISTOLOGIE - ANATOMIE PATHOLOGIQUE

Professeur titulaire	M. VAN HAVERBEKE
Professeur sans Chaire	M. CABANIE
Maître Assistant Agrégé	M. MAGNOL

Histologie - Embryologie - Anatomie Pathologique

CHAIRE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE

Professeur titulaire	M. LABIE
Maître de Conférences	M. EECKHOUTTE
Maître Assistant Agrégé	Mme BENARD

Hygiène - Inspection - Contrôle et Technologie
des denrées alimentaires d'origine animale

CHAIRE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES

Professeur titulaire	M. DORCHIES
Maître de Conférences	M. FRANC
Maître Assistant	M. DUCOS DE LAHITTE

Zoologie appliquée - Parasitologie externe - Parasitologie interne - Clinique

CHAIRE DE SEMIOLOGIE ET PATHOLOGIE MEDICALE DES EQUIDES ET CARNIVORES

Professeur titulaire	M. LESCURE
Maître de Conférences	M. GUELFI
Maître-Assistant	REGNIER

Sémiologie et pathologie médicale des équidés et carnivores
Législation vétérinaire et Déontologie clinique

CHAIRE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR

Professeur titulaire	M. TOURNUT
Maître de Conférences	M. BEZILLE
Maître Assistant	M. JOUGLAR

Sémiologie et Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour
Clinique - Clinique ambulatoire

CHAIRE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE

Professeur titulaire	M. CAZIEUX
Maître Assistant Agrégé	M. GENEVOIS
Maître Assistant	M. AUTEFAGE

Propédeutique et Sémiologie Chirurgicale - Technique Chirurgicale
Pathologie Chirurgicale - Clinique

CHAIRE DE PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION

Professeur titulaire	M. FERNEY
Professeur sans chaire	M. ROYAL
Maître Assistant Agrégé	M. TAINTURIER

Sémiologie et Propédeutique - Pathologie de la Reproduction
Obstétrique - Clinique

CHAIRE DE MALADIES CONTAGIEUSES - ZOONOSES - LEGISLATION SANITAIRE

Professeur titulaire	M. CHANTAL
Maître de Conférences	M. GANIERE
Maître Assistant	PICAVET

Maladies contagieuses - Zoonoses - Législation Sanitaire

CHAIRE DE PATHOLOGIE GENERALE - MICROBIOLOGIE - IMMUNOLOGIE

Professeur titulaire	M. LAUTIE
Maître Assistant	M. PELLERIN

Microbiologie - Immunologie - Pathologie Générale

CHAIRE DE ZOOTECHNIE ET ECONOMIE RURALE

Professeur titulaire	M. QUEINNEC
Professeur sans chaire	DARRE
Maître Assistant	Mme QUEINNEC

Ethnologie - Génétique appliquée - Hygiène générale - Zootechnie - Elevage
Economie Générale et des productions animales

CHAIRE D'ALIMENTATION

Professeur titulaire	M. FALIU
Professeur sans chaire	M. GRIESS

Botanique appliquée et Bromatologie- Agronomie - Alimentation

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

MM. les Professeurs : ANGELIER, ARMENGAUD, AUVERGNAT, BLANC, BOURBON, COMBES, COMBRET, CROS, FERNET, LE BIHAN, MAZENC, RIVES.

La Faculté et l'Ecole déclarent n'être pas responsable des opinions émises par les candidats (délibération de la Faculté en date du 10 mai 1891 et du Conseil de l'Ecole en date du 13 juin 1924).

A NOTRE PRESIDENT DE THESE :

Monsieur le Professeur BESSOU, de l'Université Paul-Sabatier de Toulouse

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury.
Hommage respectueux.

A NOTRE JURY DE THESE :

Monsieur le Professeur RUCKEBUSCH, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Qui nous a fait l'honneur de patronner cette thèse.
En témoignage de notre admiration pour tous ses travaux scientifiques.

Monsieur TOUTAIN, Maître-Assistant agrégé à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse.
Sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur G. PERES, de l'Université Claude Bernard de Lyon

Directeur de l'Institut Michel PACHA (83500 - TAMARIS sur MER)

Qu'il veuille bien trouver ici le témoignage de notre profond respect et de notre gratitude pour l'attention et les précieux conseils qu'il nous a accordés lors de l'élaboration de cette thèse.

A Messieurs Alain RIGAL et Gérard BOGE, chargés de recherche

Pour l'aide dévouée et les conseils éclairés qu'ils m'ont souvent prodigués.
Qu'ils soient assurés de ma profonde reconnaissance et de mon amitié la plus sincère.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE .- ETUDE GENERALE DES ENZYMES DE LA DIGESTION INTESTINALE CHEZ LE POISSON

I.- PARTICULARITES ANATOMIQUES DE L'APPAREIL DIGESTIF DES POISSONS

II.- LES ENZYMES PROTEOLYTIQUES

2.1. Catabolisme des molécules protidiques

2.1.1. Les endopeptidases

2.1.1.1. La pepsine

2.1.1.2. La trypsine

2.1.1.3. La chymotrypsine

2.1.1.4. Les cathepsines

2.1.2. Les exopeptidases

2.1.2.1. Les carboxypeptidases

2.1.2.2. Les aminopeptidases

2.1.2.3. Les dipeptidases

2.2. Le cas des poissons

2.2.1. Le pancréas

2.2.2. Les coeca pyloriques

2.2.2.1. Nature des sécrétions

- L'activité protéolytique globale
- L'activité trypsique et chymotrypsique
- L'activité "pepsique"
- L'activité polypeptidasique
- L'activité dipeptidasique

2.2.2.2. Origine des sécrétions

2.2.3. L'intestin

2.2.4. Le foie et la bile.

III.- LES ENZYMES GLUCIDOLYTIQUES

3.1. Catabolisme des molécules glucidiques

3.2. Le cas des poissons

3.2.1. L'amylase

3.2.1.1. L'origine de sa sécrétion
3.2.1.2. Influence du régime alimentaire sur les sécrétions amylasiques
3.2.2. Les disaccharidases

IV.- LA PHOSPHATASE ALCALINE NON SPECIFIQUE
4.1. Définition

4.2. Le cas des poissons
4.2.1. Localisation et distribution
4.2.2. Rôle physiologique

DEUXIEME PARTIE : ETUDE DE QUELQUES ENZYMES DIGESTIVES CHEZ LE LOUP OU BAR (DICENTRARCHUS LABRAX)

I.- DEFINITION DE L'ANIMAL D'EXPERIENCE : LE LOUP OU BAR (Dicentrarchus labrax)
1.1. Place dans la systématique

1.2. Biologie
1.2.1. Habitat
1.2.2. Régime alimentaire
1.2.3. Migrations reproductrices

II.- DOSAGE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES
2.1. Généralités
2.1.1. La notion d'activité enzymatique
2.1.2. Mesure de la vitesse d'une réaction enzymatique : notion d'ordre d'une réaction

2.2. Préparation des extraits enzymatiques

2.3. Dosage des protéines

2.4. L'activité protéolytique globale

2.5. L'activité de la leucine-aminopeptidase (LAP)

2.6. L'activité de la glycylglycine dipeptidase (GGDP)

2.7. L'activité α amylasique

2.8. Les activités de la maltase, la tréhalase, la sucrase et la lactase

2.9. L'activité de la phosphatase alcaline non spécifique

III.- RESULTATS

3.1. Evolution du pH dans le fluide intestinal après un repas

3.2. Etude des enzymes protéolytiques

3.2.1. L'activité protéolytique globale

3.2.2. L'activité trypsique

3.2.3. L'activité chymotrypsique

3.2.4. Les activités carboxypeptidasiques

3.2.5. L'activité de la Leucine aminopeptidase (LAP)

3.2.6. L'activité de la glycylglycine dipeptidase (GGDP)

3.3. Etude des enzymes glucidolytiques

3.3.1. L'activité α amylasique

3.3.2. L'activité de la maltase

3.3.3. Les activités de la tréhalase, la sucrase et la lactase

3.4. Etude de la phosphatase alcaline non spécifique

IV.- DISCUSSION

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

Chez les poissons, comme chez les vertébrés supérieurs, la digestion intestinale fait intervenir des sécrétions enzymatiques. Cependant, la multiplicité des espèces, la diversité de leur régime alimentaire et la complexité de leurs structures digestives sont autant de facteurs qui contribuent à poser des problèmes dès que l'on s'interroge sur l'origine, la nature et les propriétés de ces différentes enzymes digestives.

Pour parvenir à une connaissance plus approfondie des enzymes de la sphère intestinale du poisson, il nous a paru intéressant de confronter les résultats de notre étude personnelle avec les conclusions les plus marquantes des travaux déjà entrepris sur de nombreuses espèces de poissons.

Une telle perspective appelle une double démarche : la première est une étude générale des enzymes de la digestion intestinale chez le poisson, s'appuyant sur toutes les données bibliographiques disponibles. Ces trois grands groupes d'enzymes concernés par ce travail seront les enzymes protéolytiques, les enzymes glucidolytiques et la phosphatase alcaline non spécifique. Nous laisserons de côté les enzymes lipolytiques qui constituent un groupe assez particulier chez les poissons. La seconde démarche est une étude particulière de ces mêmes enzymes chez une espèce bien adaptée en Méditerranée : le loup ou bar (Dicentrarchus labrax). L'étude analytique des principales enzymes protéolytiques (trypsine, chymotrypsine, carboxypeptidases A et B), ayant déjà fait l'objet de travaux sur ce poisson, nous nous sommes cantonnés, en ce qui concerne la phase expérimentale, à la détermination de l'activité des autres types d'enzymes : il s'agit en l'occurence d'une aminopolypeptidase (la leucine-aminopeptidase ou LAP), d'une dipeptidase (la glycylglycine dipeptidase ou GGDP), de l'amylase, des principales disaccharidases (la maltase, la tréhalase, la sucrase, la lactase) et de la phosphatase alcaline non spécifique.

La confrontation de nos conclusions avec les certitudes déjà acquises, mais aussi avec les doutes qui subsistent - tels que nous les avons présentés dans la première partie - permettra, nous l'espérons, de parvenir à une connaissance plus élaborée de l'activité enzymatique et à des conclusions physiologiques plus précises.

PREMIERE PARTIE

ETUDE GENERALE DES ENZYMES DE LA DIGESTION INTESTINALE CHEZ LE POISSON

I.- PARTICULARITES ANATOMIQUES DE L'APPAREIL DIGESTIF DES POISSONS

La digestion chez les poissons met en jeu des organes digestifs (estomac, intestin) et des glandes annexes dont les principales sont le foie et le pancréas (figures 1,2 et 3).

La présence de l'estomac n'est pas constante chez les Téléostéens ou poissons osseux. En particulier, chez les Cyprinidés (carpe, tanche, barbeau... etc), on trouve à la place de l'estomac un renflement plus ou moins marqué du tube digestif, histologiquement différent du véritable organe. Ces poissons sans estomac ne secrètent ni pepsine, ni HCl. Par contre, ils semblent produire davantage de trypsine.

Le plan d'organisation de l'intestin des poissons (fig.4) diffère notablement de celui des mammifères.

- Trois couches tissulaires seulement composent sa paroi : la muqueuse, la musculeuse et la séreuse,
- le relief interne est assuré par des plis et non par des villosités,
- il ne parait pas exister de zone spécialisée comparable aux cryptes de Lieberkühn, sauf chez les Gadidés. Le rôle physiologique de ces glandes est encore mal défini. L'intestin des poissons se caractérise en outre par la présence de dispositifs propres à accroître sa surface. Les plus élaborés sont constitués par les valvules spirales et les appendices ou coeca pyloriques. Ces derniers sont des culs de sac tubulaires qui hérissent la paroi intestinale en arrière du pylore ; leur nombre très variable d'une espèce à l'autre - de 1 à plus de 200 - est souvent stable et caractéristique dans une espèce donnée. Ce sont le plus souvent des tubes simples débouchant isolément dans l'intestin (perche, truite), mais ils peuvent être bifurqués (lotte), ou même très ramifiés et serrés les uns contre les autres en un organe massif (esturgeon). Leur rôle physiologique sera envisagé au cours de l'étude des enzymes protéolytiques.

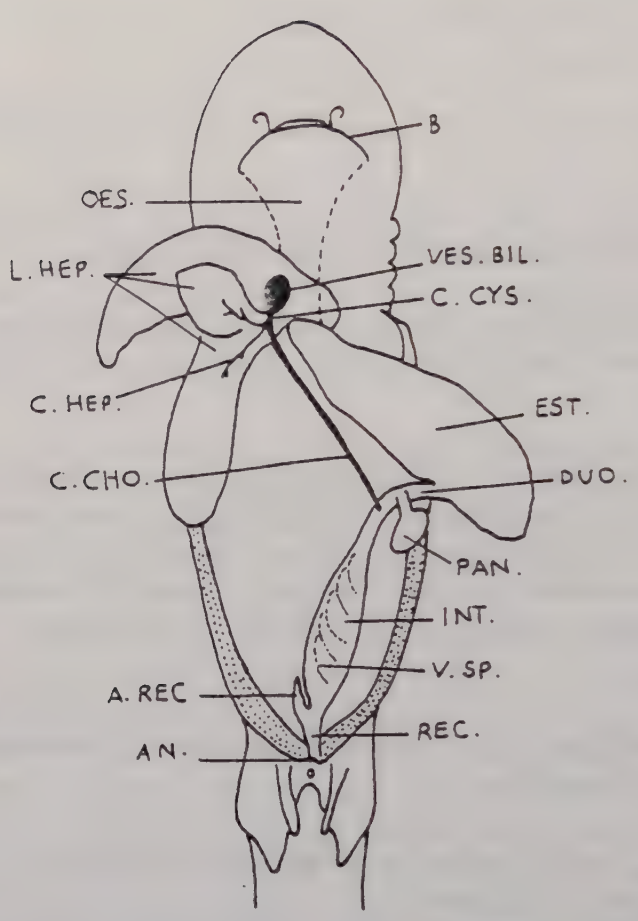


FIGURE 1.- SCHEMA THEORIQUE DE L'APPAREIL DIGESTIF D'UN POISSON CARTILAGINEUX (ELASMOBRANCHE)
(L'exemple représenté est un squale).

B. = bouche ; OES. = oesophage ; EST. = estomac ; L.HEP.= lobes hépatiques. Ils sont souvent, comme ici au nombre de trois. Pour la commodité du schéma, ils ont été déportés vers la gauche de l'animal ; DUO.= duodénum ; VES. BIL. = vésicule biliaire ; C.CYS. = canal cystique ; C.CHO. = canal cholédoque ; PAN. = pancréas ; INT. = intestin (A l'intérieur se trouve la valvule spiral V.S.P.) ; REC. = rectum ; A.REC. = ampoule rectale ; AN. = anus.

La présence d'appendices ou caecum: pyloriques débouchant dans le duodénum sitôt après le pylore est très rare chez les poissons cartilagineux.

D'après P.V. CREAC'H (1963)

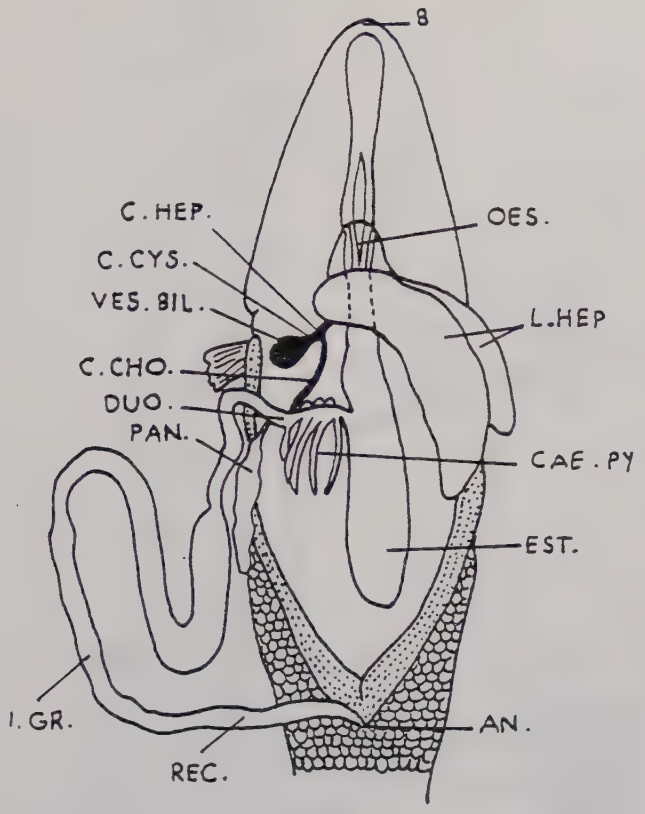


FIGURE 2.- SCHEMA THEORIQUE DE L'APPAREIL DIGESTIF D'UN POISSON OSSEUX (TELEOSTEEN) POURVU D'ESTOMAC.

B = bouche ; OES = oesophage ; EST.= estomac; L.HEP.= lobes hépatiques ; C.CYS = canal cystique; VES.BIL. = vésicule biliaire ; C.CHO.= canal cholédoque ; CAE.PYL.= caecum pyloriques (dont la présence n'est pas constante); DUO.= duodénum ; PAN. = pancréas (n'a pas toujours l'aspect compact et se trouve souvent à l'état diffus) ; I.GR. = intestin grêle ; REC. = rectum; AN. = anus.
A quelques détails près, on retrouve ici la structure générale de l'appareil digestif des poissons cartilagineux.

D'après P.V. CREAC'H(1963)

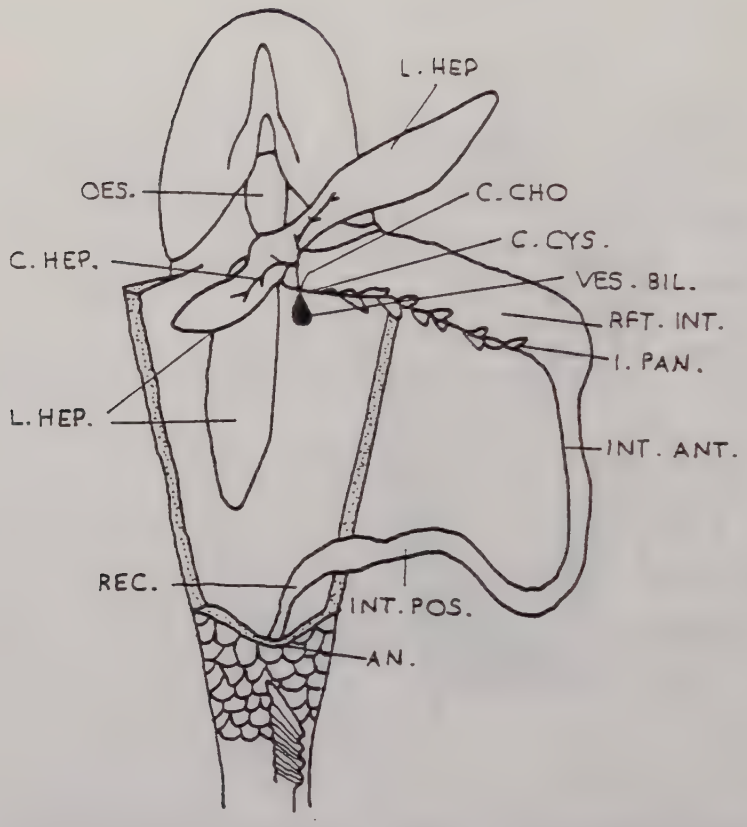


FIGURE 3.- SCHEMA THEORIQUE DE L'APPAREIL DIGESTIF D'UN POISSON SANS ESTOMAC

A l'oesophage = OE., fait directement suite un renflement de l'intestin =RFT.INT VES.BIL = vésicule biliaire ; L.HEP = lobes hépatiques ; C.CYS = canal cystique; C.CHO = canal cholédoque, évacuant aussi un suc pancréatique provenant d'ilôts de pancréas disséminés dans le foie. D'autres ilôts = I.PAN sont parfois accolés à la paroi intestinal ; INT.ANT =intestin antérieur ; INT.POS.=intestin postérieur ; REC.= rectum ; AN = anus.

D'après P.V. CREAC'H (1963)

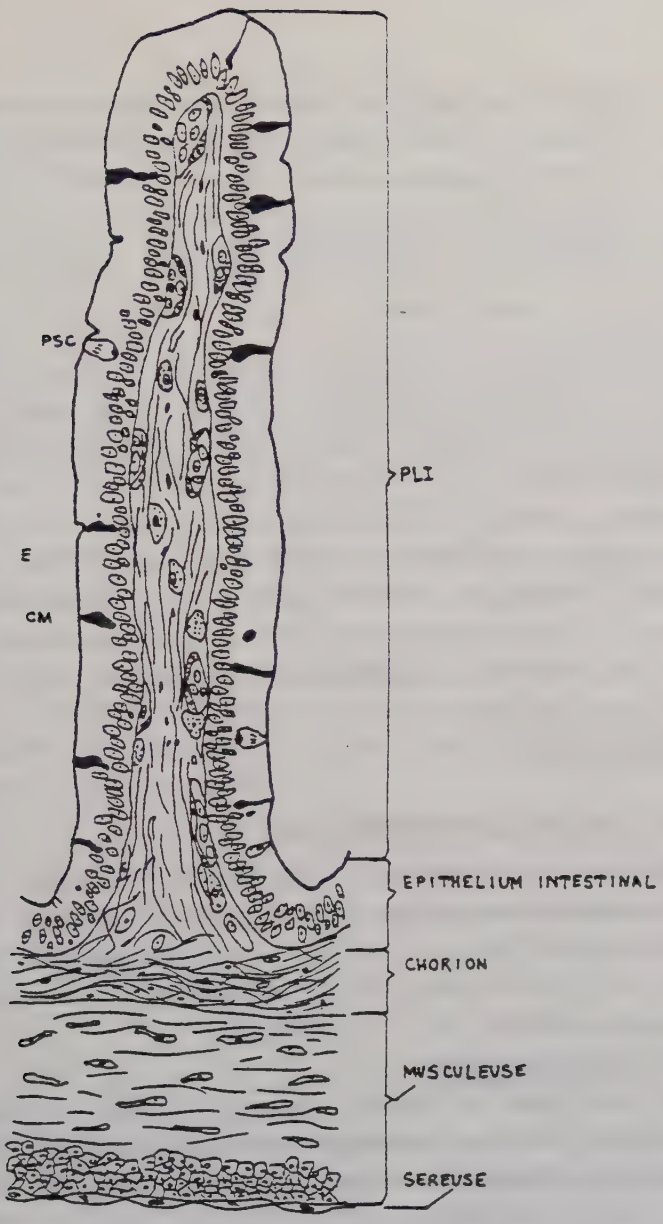


FIGURE 4 :- REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UNE PORTION DE COUPE TRANSVERSALE DE DE L'INTESTIN DE LA CARPE.

Plus simple que celles des Mammifères, la paroi intestinale de la Carpe comprend trois couches : la muqueuse formée d'un épithélium et d'un tissu conjonctif sous-épithélial, le chorion, la musculeuse composée de fibres musculaires lisses et la séreuse, qui apparait comme une simple assise cellulaire enveloppant l'intestin. L'épithélium intestinal est constitué de cellules absorbantes ou entérocytes (E) et de cellules mucosécrétantes (CM). Il contient aussi quelques "pear shaped cells" (PSC) et des cellules endocrines (non représentées sur ce dessin).

D'après N. GAS (1978)

Le foie des poissons, souvent très volumineux, présente une morphologie très variable. Il possède en général deux lobes, plus rarement un seul (anguille , brochet), voire trois lobes (thon). A de rares exceptions près (lotte), une vésicule biliaire y est toujours rattachée. Il n'existe pas de lobules dans le foie des poissons, la glande étant constituée d'un réseau de tubes glandulaires.

Le pancréas exocrine peut être compact ou diffus. Un pancréas compact et isolé, émettant ses secrétions par un conduit distinct du cholédoque n'existe que chez les sélaciens et les dipneustes. Tous les téléostéens ont un pancréas diffus, c'est à dire constitué de longues traînées irrégulières que l'on retrouve dans le mésentère ou encore à la surface de divers organes (vésicule biliaire, coeca pyloriques), voire même à l'intérieur de ceux-ci (foie). Cette forme diffuse que seule l'histologie permet de déceler, avait échappé aux premiers investigateurs. Le mode de déversement du suc pancréatique dans l'intestin demeure encore un point obscur chez les espèces à pancréas diffus.

II.- LES ENZYMES PROTEOLYTIQUES

2.1. Catabolisme des molécules protidiques

Les proteines se caractérisent par l'enchainement d'un nombre important d'amino-acides unis entre eux par des liaisons peptidiques. La destruction de ces liaisons peptidiques est possible par voie enzymatique. Les enzymes qui catalysent ces réactions sont les C.N. hydrolases plus communément appelées enzymes protéolytiques.

2.1.1. Les endopeptidases

Ces enzymes hydrolysent les liaisons peptidiques situées à l'intérieur des chaînes polypeptidiques, loin des extrémités. Leur spécificité de substrat est étroite et dépend de la présence d'amino-acides caractéristiques.

2.1.1.1. La pepsine

C'est l'enzyme caractéristique du suc gastrique. Elle résulte de l'activation d'une pro enzyme inactive, le pepsinogène synthétisé dans la muqueuse de l'estomac. La pepsine a un pH optimum en milieu très acide : pH 1,7-2,0.

2.1.1.2. La trypsine

C'est la plus importante endopeptidase du suc pancréatique des animaux supérieurs. Elle résulte également de l'activation d'une pro-enzyme inactive : le trypsinogène. La trypsine hydrolyse sélectivement les liaisons

peptidiques auxquelles participent la lysine et l'arginine par leurs groupements carboxyliques. Son pH optimal est d'environ 8,0.

2.1.1.3. La chymotrypsine

Elle résulte, elle aussi, de l'activation d'une pro-enzyme : le chymotrypsinogène. L'enzyme activatrice est la trypsine. La chymotrypsine existe dans le suc pancréatique et son pH optimum d'action se situe aux environs de 8,0. Sa spécificité de substrat est moins précise que celle de la trypsine : elle hydrolyse pratiquement toutes les liaisons peptidiques dans lesquelles sont impliquées par leur groupement carboxylique la tyrosine, la phényl-alanine, le tryptophane, la méthionine et la leucine.

2.1.1.4. Les cathepsines

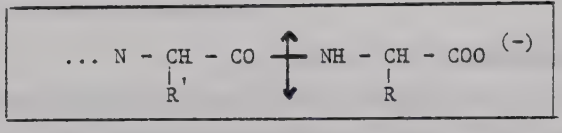
Elles sont endocellulaires. Ces enzymes possèdent soit la spécificité de la pepsine, soit celle de la trypsine.

2.1.2. Les exopeptidases

Ces enzymes hydrolysent les liaisons peptidiques situées au bout des chaînes polypeptidiques, détachant ainsi l'amino-acide terminal. On les répartit en trois catégories.

2.1.2.1. Les carboxypeptidases

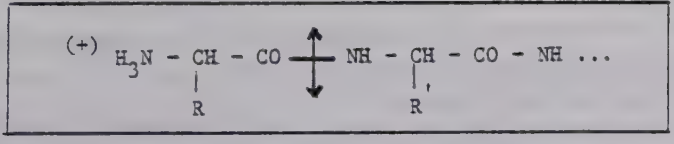
Elles ont besoin d'une charge négative (-) au voisinage de la liaison peptidique scindée et s'attaquent donc à l'extrémité carboxylique terminale du polypeptide



Certaines carboxypeptidases sont à l'état de pro-enzyme inactive. La transformation de la pro -enzyme en enzyme active est réalisée par la trypsine.

2.1.2.2. Les aminopeptidases

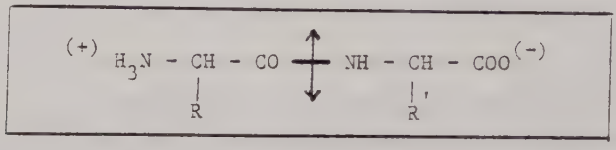
Elles ont besoin d'une charge positive (+) au voisinage de la liaison peptidique scindée ; elles s'attaquent donc à l'extrémité aminée terminale du polypeptide.



Ces enzymes sont nombreuses. On extrait de l'intestin une leucine aminopeptidase (LAP) qui n'agit que s'il existe un radical leucine.

2.1.2.3. Les dipeptidases

Elles ont besoin de la présence d'une charge (+) et d'une charge (-) au voisinage immédiat de la liaison peptidique scindée.



On en connait plusieurs, parmi lesquelles on peut citer la glycyl-glycine dipeptidase (GGDP), qui hydrolyse spécifiquement le plus petit des peptides.

2.2. Le cas des poissons

Chez les poissons, la digestion des protéines représente un phénomène important car ces molécules sont essentielles pour leur métabolisme. Quatre organes participent à l'hydrolyse de ces protéines :

- le pancréas,
- les coeca-pyloriques
- l'intestin
- le foie et la bile.

2.2.1. Le pancréas

Des activités trypsiques chymotrypsiques et carboxypeptidasiques ont été reconnues dans cet organe chez de nombreuses espèces.

Le pancréas d'Elasmobranches des genres Mustelus, Carcarias et Squalus renferme une "trypsine" inactive (trypsinogène) capable d'être activée par des extraits d'intestin comme l'a montré Sullivan (1908). Cette activation serait analogue à celle qui existe chez les mammifères où les enzymes protéolytiques sont secrétées sous forme inactive par le pancréas puis activées au contact de la muqueuse intestinale.

Le tissu pancréatique de Scoliodon sorrakowah et Sphyrna blochii contient également des précurseurs inactifs des enzymes protéolytiques comme le montre l'expérience suivante (Ghanekar et Bal 1955). Un extrait de pancréas est mélangé à un extrait de muqueuse intestinale dont l'activité protéolytique propre est faible. Assez rapidement, le pouvoir protéolytique passe par un

maximum pour trois valeurs de pH égales à 4,0, 6,0 et 8,0. Ainsi, l'extrait pancréatique renfermerait trois pro-enzymes : une procatheptase, un chymotrypsinogène et un trypsinogène, dont les trois activateurs correspondants se trouveraient dans l'extrait de muqueuse intestinale. Toutefois des enzymes protéolytiques directement actives existeraient également dans le pancréas de ces poissons, où elles présentent un optimum à pH 8,0. Chez l'anguille (Anguilla japonica), il semble aussi que des extraits pancréatiques présentent d'emblée en milieu alcalin une activité protéocatalytique attribuée à une trypsine dont l'optimum de pH se situerait aux environs de 8,0 (Oya et al 1927) .

Une activité carboxypeptidasique a été également mise en évidence dans des extraits pancréatiques de Scolodion Sorrakowah et Sphyrna blochii (Ghanekar et Bal 1955) . L'efficacité des extraits obtenus étant doublée après un chauffage de 25° C à 37° C, les auteurs supposent la présence d'une pro-enzyme dont la conversion en enzyme active serait autocatalytique à cette température. Il est également possible que la trypsine présente dans l'extrait soit responsable de cette activation, ou qu'elle ait déclenché ce processus plus indirectement.

2.2.2. Les coeca pyloriques

2.2.2.1. Nature des secrétions

De nombreuses activités enzymatiques protéolytiques ont été observées au niveau des coeca pyloriques.

- L'activité protéolytique globale

Chez Lutjanus Aya., Bodansky et Rose (1922) signalent une activité protéolytique dans les coeca pyloriques, dont l'optimum de pH est compris entre 6,0 et 8,0. Chez Thunnus orientalis, cette activité a été également mise en évidence à un pH de 7,6 (Togasawa et Katsumata 1957-1958). Chez Gadus sp et l'églefin (Gadus aeglefinus), l'enzyme présente un optimum sensiblement plus élevé situé entre 8,0 et 8,5 (Jonhston 1937) Cooke et Chowdhury (1948) montrent également que les coeca pyloriques de la plupart des salmonidés renferment une activité protéolytique importante dont l'optimum est compris entre 8,0 et 8,5. Enfin, Stern et Lockhart (1953) enregistrent, au niveau des coeca-pyloriques de Sebastes marinus, une élévation de l'activité protéolytique sous l'influence d'une augmentation de température.

- L'activité trypsique et chymotrypsique

Une activité trypsique a souvent été décrite dans les coeca pyloriques. Il convient toutefois de noter que la plupart des auteurs ont systématiquement appelé trypsine n'importe quelle enzyme manifestant une importante activité protéolytique en milieu alcalin.

Au sein des coeca pyloriques d'un thon (Katsuwonus vagans), Kashiwada (1952) montre que l'activité "trypsique" est susceptible d'évoluer au cours d'un cycle annuel. Elle passe ainsi par un maximum à la fin du mois d'avril puis décroit régulièrement jusqu'au mois d'août. Il existerait une corrélation entre l'apparition de ce maximum d'activité et l'ampleur du tonnage de poisson capturé. Ananichev (1959) signale aussi que chez certains poissons d'eau douce, la plus grande activité "trypsique" correspond à la période d'alimentation la plus intense. Complétant ces données, Almy (1926) note enfin que l'activité "trypsique" des extraits de coeca pyloriques de hareng est plus élevée au cours de la digestion que durant le jeûne.

Croston (1960) met en évidence l'activité de la trypsine et de la chymotrypsine dans les coeca pyloriques de saumon, avec des pH optimaux aux environs de 9,0. Il montre également que l'activité de la trypsine est inhibée, comme chez les mammifères, par le facteur antitrypsique du soja. Des résultats analogues ont été trouvés chez la chimère et la myxine (Nilson et Fange 1969-1970), le maquereau (Ooshiro 1971) ainsi que chez plusieurs autres espèces (Zendzian et Bernard 1967).

- L'activité " pepsique "

Plusieurs auteurs ayant noté que les extraits de coeca pyloriques de divers poissons présentaient une activité protéolytique en milieu acide conclurent à la présence d'une " pepsine ". Cette présence se manifesterait en fonction de l'espèce considérée et s'associerait ou non à celle de la "trypsine" qui vient d'être étudiée au paragraphe précédent.

A ce sujet, bien que remontant à 1878, les observations de Krukenberg semblent devoir encore retenir l'attention (tableau I). Cet auteur rapporte en effet que la "pepsine" est présente chez de nombreuses espèces de poissons au niveau des coeca pyloriques. Depuis de nombreuses observations ont complété ces résultats. Ainsi, Bodansky et Rose (1922) ont trouvé une activité protéolytique dans les extraits glycérolés de coeca pyloriques de Lutjanus aya. Elle passe par deux maxima : le premier à pH 2-2,6, l'autre, plus élevé à pH 7. Battle (1935) signale une "activité pepsique" dans l'extrait de la muqueuse des coeca pyloriques de hareng (Clupea harengus). Chez la sardine, Fujii et al (1951) notent également une activité protéolytique très sensible en milieu acide, conjointement à la forte activité habituellement signalée en milieu basique (tableau II). Citons enfin une activité notable à pH 6 des extraits de coeca pyloriques de thon, signalée par Tagasawa et Katsumata (1957).

TABLEAU I

Répartition chez diverses espèces de poissons
des activités "pepsique" (en milieu acide) et "trypsique" (en milieu alcalin)
manifestées par les extraits de caecums pyloriques

(D'après KRUKENBERG (1878))

ESPECES	Activité pepsique	Activité trypsique
Esturgeon (Acipenser sturio)	+	+
Loche (Motella tricirrata)	+	+
Baudroie (Lophius piscatorius)	+	+
Vive (Trachinus draco)	+	+
Rascasse (Scorpoena scrofa)	+	+
Saint-Pierre (Zeus faber)	+	+
Ombrine (Umbrina cirrosa)	+	0
Oreille (Uranoscopus scaber)	+	0
Daurade (Chrysophrys aurata)	+	0
Alose finte(Alosa finta)	0	+
Grondin (Trigla hirundo)	0	+

Le signe + indique une activité mesurable ; le signe 0 une activité nulle.

TABLEAU II

Activité comparée de la digestion acide et alcaline par un extrait de caecums pyloriques de sardine

(D'après FUJII et al. (1951))

pH	Durée de l'incubation	N-aminé apparu (°)
	h	
5,5	90	1,384
8,5	65	3,883

(°) Exprimé en mg/g de préparation enzymatique sèche mise en oeuvre.

t = 35°C Substrat = caséine

Cependant, en ce milieu faiblement acide, il est fort possible qu'une enzyme active en milieu alcalin ne perde pas toute efficacité.

Il paraît assez curieux qu'une enzyme protéolytique active en milieu acide soit secrétée par les coeca pyloriques, c'est à dire dans un milieu réputé alcalin. Aussi, des auteurs tels que Johnston (1941) admettent qu'il pourrait s'agir d'une contamination d'origine gastrique.

- L'activité polypeptidasique

Si le contact entre un extrait de coeca pyloriques de morue et le substrat protéique est prolongé à pH 8,0, des acides aminés libres apparaissent dans le milieu. Johnston (1941) suppose que leur présence traduit une activité polypeptidasique s'exerçant sur les polypeptides prouvant de l'action de la "trypsine" sur la caséine. Il en rend responsable une carboxy-peptidase.

- L'activité dipeptidasique

La présence dans les coeca pyloriques d'activités dipeptidasiques est connue chez de nombreuses espèces de poissons. Ces enzymes présentent une spécificité de substrat étroite.

Dans les extraits de coeca pyloriques d'un thon (Thunnus orientalis) d'une bonite (Katsuwonus pelanys)et de la sériole (Seriola quinqueradiata), Togasawa et Katsumata (1956) ont mis en évidence la présence d'une dipeptidase capable d'hydrolyser la glycylglycine. En plus de la glycylglycine, les coeca pyloriques de ces poissons hydrolysent légèrement la sarcosylglycine, mais demeurent sans action sur la N-diméthyl-glycylglycine,la glycylsarcosine et la glycylglycinamide. La spécificité de la glycylglycinedipeptidase est donc relativement étroite.

Des dipeptidases hydrolysant notamment la glycylleucine, la glycyl-phénylalanine ou la phénylalanylglycine ont récemment été identifiées par Ash (1979-1980) dans les coeca pyloriques de la truite arc en ciel.

2.2.2.2. Origine des sécrétions

Plusieurs théories concernant l'origine des sécrétions enzymatiques des coeca pyloriques ont été proposées.

Avec Cuvier, les anciens physiologistes pensaient que les coeca

pyloriques tenaient le rôle du pancréas Krukenberg (1878) fut le premier à y décrire deux activités protéolytiques, l'une en milieu acide, l'autre en milieu alcalin. Il les attribua respectivement à une " pepsine " et à une "trypsine". Bondouy (1899), Fehlmann (1915), Bodansky et Rose (1922), et Chesley (1934) attribuent aux coeca pyloriques la production d'enzymes plus ou moins analogues à celles habituellement sécrétées par le pancréas des mammifères. Ce dernier auteur pense même que les appendices pyloriques pourraient efficacement suppléer un pancréas diffus qu'il suppose peu zymogène. Enfin, Battle (1935), qui met en évidence chez le hareng "trypsine", amylase et lipase dans des extraits de coeca pyloriques broyés, pense avoir démontré : " qu'il faut admettre au niveau des coeca pyloriques, une considérable partie de l'activité digestive autrefois attribué au pancréas ".

Pour d'autres auteurs, l'activité enzymatique décelée au niveau des coeca pyloriques proviendrait essentiellement soit du suc pancréatique soit du suc gastrique entraîné en même temps que les aliments. Cette idée, défendue dès 1877 par Edinger, fut développée plus tard par Mac Callum et Jacobshagen (1937). Elle a reçu l'approbation d'auteurs tels que Vonk (1937) et Schlottke (1938-1939).

Chez les espèces à pancréas diffus, l'examen histologique montre que le tissu pancréatique est très souvent étroitement adhérent à la paroi des coeca pyloriques. Certaines "trypsines" décrites pourraient être en fait d'origine pancréatique et non coecale sensu-stricto. Toutefois, si l'on admet que les enzymes décrites proviennent des îlots pancréatiques adhérents à la paroi des coeca, on doit concevoir l'existence de canaux draînant le suc pancréatique vers la lumière coecale. Malheureusement, cette hypothèse n'est pas confirmée par les observations de Legouis (1873) et celles de Bernard (1952). Ce dernier auteur, examinant soigneusement les coeca pyloriques de truites arc en ciel, n'a jamais pu découvrir un débouché d'éventuels canaux pancréatiques dans la lumière coecale.

Par ailleurs, on peut noter, chez certaines familles, comme les gadidés, la coexistence d'un pancréas compact et de coeca pyloriques riches en "trypsine" et même en peptidase (Johnston 1937-1941).Vu la proximité du pylore et du canal de Wirsung, le contenu des coeca peut être contaminé par du suc pancréatique. Cependant, on imagine difficilement qu'au sein de "contaminations" la concentration enzymatique puisse être suffisamment élevée pour obtenir de telles concentrations.

Aucune des différentes hypothèses proposées ne paraît donc résoudre le problème de l'origine des sécrétions enzymatiques des coeca pyloriques de façon satisfaisante.

2.2.3. L'intestin

L'existence d'une sécrétion d'enzymes protéolytiques par la muqueuse intestinale a été longtemps controversée.

En 1909, Cohnhein maintient en survie, dans une solution de Ringer additionnée de sang défibriné et de différents peptides, des intestins de Crenilabrus parvo et de Labrus festivus. En fin d'incubation, une partie de l'azote du contenu intestinal a traversé la paroi, non plus sous forme de peptides, mais principalement sous celle d'acides aminés. Comme chez les mammifères, l'intestin des poissons semble déjà être le siège d'un processus d'hydrolyse enzymatique des peptides. Ces expériences ont ouvert la voie aux recherches destinées à préciser la nature des sécrétions enzymatiques de la muqueuse intestinale des poissons.

Chez la perche, Hykes et al (1934) ont décelé une quantité importante de "trypsine". Ces caractéristiques de fonctionnement optimal seraient les suivantes :

Substrat	pH optimum	température optimum °C
Gélatine	9,36	26
Albumine d'oeuf	12,3	37
Fibrine	12,86	25/37

pH et température correspondant au maximum d'activité des extraits glycérolés de la muqueuse intestinale de Perca fluviatilis (D'après Hykes et al (1934)).

Bayliss (1935) rapporte également la présence d'une enzyme analogue chez Pleronectes platessa, avec un pH optimum compris entre 7,5 et 8,5. Johnston (1941) identifie lui aussi une trypsine active à pH 8,0 au niveau de la muqueuse intestinale. Beauvalet (1933), enfin, décrit une activité protéolytique en milieu alcalin au niveau de la muqueuse du segment intestinal compris entre

le pylore et la valvule spirale de Scyllum canicula.Ni la valvule spirale, ni la zone rectale ne présentent une propriété similaire.

Pour Al Hussaini (1949), il existerait une sécrétion propre de trypsine par l'épithélium intestinal. Selon lui, chez la carpe, le gardon et le goujon, les cellules caliciformes de l'intestin sécréteraient du mucus et du "zymogène". L'auteur précise qu'il a pris la précaution d'éliminer le contenu intestinal par lavage et d'inactiver le pancréas par une courte immersion dans le liquide de Bouin avant confection des extraits.

Schlottke (1940-1941) contestera cette hypothèse. Poursuivant des recherches chez la perche, la lotte, la truite et la carpe, cet auteur signale que, pendant l'ingestion de nourriture, une activité trypsique d'origine pancréatique apparaît d'abord dans la lumière de l'intestin, puis au niveau de la muqueuse intestinale. Comme la teneur en trypsine augmente dans l'épaisseur de la muqueuse plus tardivement que dans la lumière intestinale, il conclut en accord avec Vonk, que l'enzyme a été absorbée par la muqueuse postérieurement à son élaboration par le pancréas.

Si l'existence de la sécrétion de trypsine par la muqueuse de l'intestin a été longtemps discutée, celle de l'entérokinase n'a jamais été contestée. Sullivan (1908) qui étudie des extraits pancréatiques d'Elasmobranches des genres Mustelus Carcarias et Squalus montre qu'un activateur de type entérokinase se rencontre au niveau de la muqueuse intestinale. Cet activateur est absent de la muqueuse gastrique et de la glande rectale des Elasmobranches. Cette analogie avec les mammifères est confirmée par Polimanti (1912) et Babkin (1929).

De ces principaux travaux, il ressort que chez les poissons comme chez les mammifères la dégradation des macromolécules protéiques est effectuée par une trypsine pancréatique ou coecale. Des enzymes plus spécifiques de la paroi intestinale complètent ensuite cette hydrolyse. Schlottke a été le premier à fournir une interprétation "moderne" de la digestion intestinale chez les poissons. Après avoir reconnu l'origine pancréatique de la trypsine, il a ensuite envisagé l'existence de sécrétions polypeptidasiques par l'épithélium de l'intestin ou des coeca pyloriques et la présence de dipeptidases intracellulaires parachevant l'hydrolyse des protéines. La confirmation de l'existence de telles enzymes a été récemment apportée par quelques auteurs.

Crane et al (1979) ont décrit une leucylnaphthylamidase au niveau de la paroi cellulaire de la valvule spirale de Scyllum canicula. Ash (1979-1980), Bogé et Rigal (1981) ont pu préciser le caractère endocellulaire de plusieurs dipeptidases chez la truite arc en ciel.

2.2.4. Le foie et la bile

Des enzymes digestives ont été mises en évidence dans la bile, notamment chez Fundulus (Babkin et Bowie 1928 , Mac Kay 1929), chez Pleuronectes (Bayliss 1935) et chez la carpe (Schlottke 1941).

L'origine pancréatique de ces enzymes a été reconnue chez Fundulus par Babkin et Bowie. Ces auteurs ont en effet observé que la vésicule biliaire de ce poisson était entourée par des îlots pancréatiques d'où partiraient les sécrétions enzymatiques. A l'appui de cette hypothèse, Mac Kay chez Fundulus et Bayliss chez Pleuronectes ont observé que la bile ne contenait plus d'enzymes si le tissu pancréatique qui entoure la vésicule biliaire est détruit par une courte immersion dans le fixateur de Bouin.

En contrepartie, chez d'autres espèces comme Scyllum Canicula, l'élaboration des enzymes protéolytiques pourrait s'effectuer dans le foie. En effet Beauvallet (1933) montre que le foie et la bile de ce sélacien sont capables de dégrader la fibrine. Le foie de Scolodion sorrakowah et Sphyrna blochii renferme également trois enzymes protéolytiques qui sont activées par des substances extraites de la muqueuse intestinale.

III.- LES ENZYMES GLUCIDOLYTIQUES

3.1. Catabolisme des molécules glucidiques

Chez les mammifères, les glucides ingérés sont réprésentés essentiellement par des oses, des di-tri ou tetraholosides et des polyholosides. Les holosides sont absorbés après hydrolyse par des enzymes spécifiques sécrétées par le tractus digestif ou élaborées par les constituants de la flore intestinale.

Les α amylases de la salive et du pancréas attaquent les liaisons α (1 $\longrightarrow$ 4) situées à l'intérieur des macromolécules glucidiques représentées surtout par l'amidon et le glycogène. Il se forme des dextrines dont les liaisons osidiques α(1 $\longrightarrow$ 6) sont scindées à leur tour par une enzyme intestinale. Les diholosides résiduels sont ensuite dégradés par des disacchari-

dases spécifiques : la maltase dans le cas du maltose, la saccharase pour le saccharose et la tréholase pour le tréholose notamment. Ces enzymes sont généralement présentes dans la bordure en brosse des cellules intestinales.

Des enzymes peuvent être également détectées dans la cavité intestinale, provenant soit de microorganismes, soit de cellules desquamées dont le contenu est ainsi déversé dans l'intestin.

3.2. Le cas des poissons

La digestion des glucides représente une activité réduite chez les poissons, surtout s'ils sont carnivores. Toutefois, une amylase et différentes disaccharidases ont été identifiées.

3.2.1. L'amylase

3.2.1.1. L'origine de sa sécrétion

L'origine de la sécrétion de l'amylase a été longtemps controversée. Chez les Elasmobranches, l'amylase est sécrétée exclusivement par le pancréas (Sullivan 1907, Babkin 1929, Beauvallet 1933). Par contre, chez les Téléosteens, cette enzyme a été décelée à tous les niveaux du tube digestif, que ce soit chez des espèces sans estomac (Ishida 1936, Al Hussaini 1949, Sarbahi 1951, Jancarik 1964 et Kawai et Ikeda 1971) ou bien chez des espèces possèdant un estomac ou à la fois un estomac et des coeca pyloriques (Babkin et Bowie 1928, Chesley 1934, Bayliss 1935, Ishida 1935, Fish 1960 et Nagase 1964). Cette situation a conduit ces auteurs à admettre que le pancréas ne serait pas l'unique lieu d'élaboration et de sécrétion de cette enzyme.

Vonk (1937) s'est inscrit à faux contre cette interprétation. Cet auteur trouve en effet que la concentration de l'amylase dans les extraits pancréatiques de la carpe est environ 50 à 100 fois plus importante que dans les extraits d'intestin. Il affirme alors que l'amylase détectée au niveau de l'intestin provient uniquement du pancréas.

Les travaux de Yamane (1970-1972) mettront fin à cette polémique. En utilisant des techniques beaucoup plus fines (méthode histochimique de Schear et Pearce 1963), cet auteur établira en effet de manière définitive que le pancréas représente chez le poisson la seule source d'amylase digestive et que les cellules épithéliales de la muqueuse du tube digestif ne participaient pas à la production ou à la sécrétion de cette enzyme.

3.2.1.2. Influence du régime alimentaire sur les sécrétions amylasiques

D'après Yonge (1937) : " Il y a une corrélation certaine entre la nourriture de chaque animal et la nature et les puissances d'action relatives de leurs enzymes digestives ". Cette observation a été confirmée par Al Hussaini notamment. Cet auteur constate en effet chez le Gobio carnivore que les enzymes protéolytiques sont plus abondantes que les enzymes amylalytiques alors que chez le cyprin herbivore cette répartition est inversée.

Par ailleurs, Vonk (1941) précise qu'un poisson herbivore comme la carpe produit environ 100 fois plus d'amylase qu'un poisson carnivore comme le brochet ou le chien de mer. (Squalus Acanthias). En contrepartie, il montre que l'activité trypsique du pancréas du chien de mer et du brochet n'est que 8 fois supérieure à celle de la carpe. La spécialisation des espèces carnivores apparait donc plus étroite que celle des herbivores qui peuvent plus facilement s'adapter à un autre régime nutritionnel.

Schlottke (1940) montre en outre que la production de l'amylase subit des fluctuations d'une espèce à l'autre pour un même régime alimentaire. Ainsi, si la teneur en amylase est faible chez la lotte, elle est plus faible encore chez la truite et elle se réduit à l'état de traces chez la perche.

3.2.2. Les disaccharidases

On admet communément que le maltose est le principal produit de l'action de l'amylase digestive et l'on doit s'attendre à ce qu'une maltase prenne le relai de l'enzyme précédente.

Chez la carpe, la maltase est présente essentiellement dans les sécrétions du pancréas (Vonk 1937). Cette situation est analogue chez la lotte où il existe plus d'amylase et de maltase dans le suc pancréatique que dans l'intestin (Schlottke 1940). Ishida (1936) signale la présence de maltase dans l'intestin de quatre poissons sans estomac : Calotomus, Spheroïdes, Thalassoma, Salarias. Chez toutes ces espèces, l'enzyme est également présente dans le"foie" (foie et pancréas), sauf chez Salarias, le seul des quatre chez qui cet organe n'est pas pénétré par le pancréas. Enfin Crane et al (1979) ont mis en évidence récemment l'existence d'une quantité importante de maltase au niveau de l'intestin d'un Sélacien : Scyliorhinus canicula. Tous ces résultats montrent qu'il est difficile de démontrer l'existence d'une chaine d'action des enzymes glucidolytiques analogue à celle des mammifères où l'étape ultime de la dégradation des sucres a lieu exclusivement dans l'intestin.

En plus de la maltase, d'autres disaccharidases ont été également identifiées dans le tube digestif des poissons : notamment une saccharase (invertase) décelée par Kenyon (1925) au niveau des coeca pyloriques et de l'intestin de la tanche, de la carpe et du brochet. Ishida (1936) décrit également cette enzyme chez quatre poissons sans estomac : chez le Salarias, cette enzyme est présente dans l'intestin, absente dans le foie ; chez le Spheroïdes, on la trouve dans le " foie " mais pas dans l'intestin ; chez le Thalassoma aussi bien dans le " foie " que dans l'intestin et chez le Calotomus surtout dans l'intestin postérieur. Une amygdalase (bien connue chez l'escargot : Hélix pomatia), une salicinase et une lichenase ont été également décrites au niveau de l'intestin de Calotomus et Salarias, tous deux herbivores. Enfin Kawai et Ikeda (1970) ont détecté une lactase, une mélibiase, une cellobiase et une méthylα D glucosidase dans l'intestin de la carpe.

IV.- LA PHOSPHATASE ALCALINE NON SPECIFIQUE

4.1. Définition

Les phosphatases sont des hydrolases libérant de l'acide orthophosphorique à partir de composés phosphorés minéraux ou organiques ; elles se présentent sous diverses formes : phosphomonoesterase, diesterase, phosphoaminase, pyrophosphatase etc...

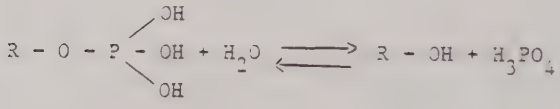
Les phosphomonoestérases sont les mieux connues et les plus répandues. Dans ce groupe, on distingue essentiellement deux types d'enzymes définies d'après leur pH optimum d'action :

- la phosphatase alcaline ou phosphomonoestérase de type I, active dans un milieu de pH alcalin (entre 8,0 et 9,0),

- la phosphatase acide ou phosphomonoestérase de type II, active dans un milieu de pH acide (entre 5,0 et 6,0).

La phosphatase alcaline est de beaucoup la plus répandue dans les tissus animaux. Elle est abondante dans le rein, la muqueuse intestinale (bordure en brosse) et les os en croissance. La glande mammaire, le foie, le placenta en sont également riches. Elle est décelable en proportion moindre dans les hématies. Les plaquettes sanguines, le plasma, le cerveau, l'urine et le liquide céphalo-rachidien en renferment une faible quantité. La phosphatase alcaline ne parait pas exister chez les végétaux.

Ces enzymes catalysent la réaction générale suivante :



Elles hydrolysent de façon non spécifique les esters phosphoriques et sont activées par un certain nombre de cations bivalents dont les plus importants sont Mg^{++} et Zn^{++}.

4.2. Le cas des poissons

4.2.1. Localisation et distribution

Une activité phosphatase alcaline existe au niveau des plis de l'intestin et des coeca pyloriques des Téléostéens (Al Hussaini 1948-1949, Srivastava 1966, Sivadas et Govindan 1970, Goel et Sastry 1973, Shaffi et al 1974, Sinha 1978 et Crane et al 1979). D'autres sites présentant une activité variable ont également été caractérisés : l'épithélium stratifié de la cavité bucco-pharyngienne, le chorion et les vaisseaux sanguins de l'intestin de Cyprinidés (Al Hussaini 1948) ; le stratum compactum chez le Gobie (Al Hussaini 1949) ; les glandes gastriques et les entérocytes de l'intestin de Tilapia mossambica (Sivadas et Govindan 1970).

Selon plusieurs acteurs (Prakash 1961, Tanaka 1972, Kawai et Ikeda 1971), il existerait une modification de l'activité de la phosphatase alcaline au cours du développement chez les poissons.

4.2.2. Rôle physiologique

Chez les poissons, on a pu rattacher l'activité de la phosphatase alcaline aux processus d'absorption (Gas 1976, Sinha 1978). En particulier, chez l'anguille (Anguilla Japonica) la phosphatase alcaline jouerait un rôle dans les mouvements d'eau et d'électrolytes à travers la paroi intestinale (Utida et Isono 1967).

Les phosphatases alcalines participeraient également aux phénomènes d'adaptation survenant au cours des transferts d'eau douce en eau de mer et réciproquement. Ainsi, chez l'anguille (Anguilla Japonica), il apparait au cours de la période d'acclimatation au milieu marin, un accroissement de l'activité de la phosphatase alcaline intestinale (Oide 1970).

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DE QUELQUES ENZYMES DIGESTIVES CHEZ LE LOUP OU BAR (Dicentrarchus labrax)

I.- DEFINITION DE L'ANIMAL D'EXPERIENCE : LE LOUP OU LE BAR (Dicentrarchus labrax)

C'est à Pline que l'on doit attribuer le terme lupus, qui est étymologiquement à l'origine du nom vulgaire, sous lequel l'animal est connu sur le littoral méditerranéen. Son synonyme bar est surtout utilisé sur la côte Atlantique.

1.1. Place dans la systématique

Super classe	Poissons
Classe	Osteichthyens
Super ordre	Téléostéens
Ordre	Perciformes
Sous ordre	Percidés
Famille	Serranidés
Genre	Dicentrarchus.

Deux espèces fréquentent nos côtes : Dicentrarchus labrax (figure 5) et Dicentrarchus punctatus. A première vue, leur distinction est facile grâce à la ponctuation de Dicentrarchus punctatus appelé loup moucheté ou loup tacheté. Mais pour les auteurs qui ont travaillé sur des spécimens méditerranéens, ce critère n'est pas suffisant car il existe chez 90 p.100 des jeunes loups des taches qui ne disparaissent parfois qu'à l'âge de deux ans ; ils ont donc recherché d'autres caractères spécifiques pouvant être utilisés avec facilité pour la diagnose des espèces (tableau III).

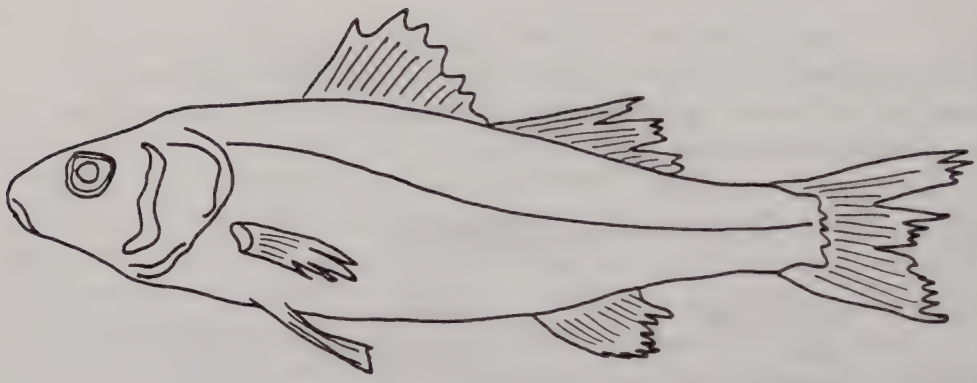
1.2. Biologie

1.2.1. Habitat

Le loup est un poisson de rocher qui aime les eaux agités : cela s'explique par un besoin important en oxygène. Il ne quitte pas le plateau continental et sa vie peut être divisé en deux périodes : une période de chasse à la saison chaude et une période de reproduction en hiver.

FIGURE 5

DICENTRARCHUS LABRAX L



Nom commun BAR-LOUP (littoral méditerranéen)

Autres appellations encore en usage :

- BROK-DRENEK (Bretagne)
- BARREAU-LOUBINE (Vendée)
- LUPINA (Pays basque)
- LlOUBARROU (Roussillon)
- LOUBAS (Provence)
- RAGNOLA (Corse)

TABLEAU III

Caractères utilisés dans la diagnose
de Dic Labrax et Dic punctatus

d'après Barnabé (1976)

Caractères	Labrax	Punctatus	Auteur
Rayons mous 2° dorsale	12	13	Gravier 196I
Ecailles ligne latérale	mode 70	Mode 60	
Branchiospines	mode 25	Mode 28	Gravier 196I
Dents du Vomer	partie antérieure	Tout le Vomer	Moreau 189I
Ecailles inter-orbitaires	cycloïdes	cténoïdes	Fowler 1936
Proportions du corps Longueur/hauteur	4 à 4,5 (sans caudale)	3,5 à 4	Lozano y Rey 1952
Proportions dominantes	Tête Sous orbitaire Distance prédorsale	Nageoire caudale Pédoncule caudale Oeil	Gravier 196I

1.2.2. Régime alimentaire

Le loup est un poisson prédateur. Dans la composition de son régime alimentaire, nous retrouvons essentiellement trois groupes d'aliments : les crustacés, les poissons et les mollusques en proportion moindre.

Les crustacés représentent un aliment de choix. Les plus consommés sont un crabe - surtout en période de mue - Macropipus depurator - et une crevette : Crangon-crangon .Les poissons sont essentiellement représentés par la sardine (Sardina pilchardus), l'anchois (Engraulis encrasicaulus), les Gobies (Gobius sp)et la sprat (Sprattus sprattus).

Cette alimentation est fonction, bien sûr, du mode de vie. Un loup sédentaire a moins de chances de rencontrer un banc d'anchois ou de sprats qu'un loup chasseur qui le recherche. Il s'attaquera donc par la force des choses aux crabes et aux crevettes qui vivent à proximité de son refuge. Les saisons jouent aussi un rôle important ; les anchois et les sprats n'approchant les rivages qu'à la belle saison.

1.2.3. Migrations reproductrices

Les migrations ont été bien observées en Méditerranée. En hiver, les loups désertent les eaux saumâtres des estuaires et des étangs et se regroupent en mer pour frayer du mois de novembre au mois de mars. La première lune qui suit le premier novembre détermine très exactement la première concentration à la sortie des étangs. Au moment de la ponte, les loups se répartissent en petits groupes ; une à trois femelles suivies d'un vingtaine de mâles fréquentent alors les bords de mer et chassent près des brisants. La fraie a lieu dans un endroit calme sur un lit de sable.

Fin février, après la fraie, les loups se regroupent à nouveau pour regagner les estuaires et les étangs. C'est le phénomène de la "repasse". Un certain nombre d'entre eux restent en mer.

1.3. Conditions d'entretien des animaux

Les loups utilisés proviennent de la DEVA sud de Palavas (Hérault 34) Ils pèsent environ 60 grammes et correspondent à la catégorie d'âge 0^+ (animaux d'un été).

Ces animaux sont élevés dans des bacs de 200 litres, en circuit fermé convenablement aérés. La température est maintenue à 18°C $\pm$ 1°C à l'aide de résistances immergées. La salinité est de 37°/oo $\pm$ 1°/oo. Des

TABLEAU IV

Composition des granulés utilisés dans l'alimentation des bars
(à l'Institut Michel PACHA - Tamaris)
1979-1980

ALIMENTS PISCICOLES (AQUALIM)

Fabriqués par Grande semoulerie de l'Ouest
16160 GOND-PONTOUVRE (Charente - France)

ALIMENT COMPOSE COMPLET POUR BAR
GRANULE - 2 mm

Date de fabrication : 15 Juin 1980
n° 00217
Composition : Concentré de protéine de poisson - farine de poisson - viande-sang - lactosérum - levure - germe de blé - gruau D - huile végétale - composé minéral - composé vitaminisé anti oxydé.

Garantie : Maximum
- Humidité 11 p.100
- Cellulose 3 p.100
- Matières minérales 13 p.100

Minimum
- Matières protéiques 50 p.100
- Matières grasses 10 p.100

Vitamines aux 100 kg
Vitamine A 2 M UI
Vitamine D_3 200 M UI
Vitamine E 10 g

Antioxydant : Ethoxyquin

Conservation des vitamines = 4 mois

aliments, sous forme de granulés (tableau IV) sont distribués ad libitum une fois par jour.

II.- DOSAGE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

2.1. Généralités

2.1.1. La notion d'activité enzymatique

Pour exprimer une quantité d'enzyme, il serait très satisfaisant de pouvoir donner un poids ou une concentration molaire du produit pur. Ceci est possible avec certaines enzymes très purifiées, mais les méthodes sont longues, laborieuses et s'appliquent mal à la pratique courante.

Actuellement, en enzymologie, on utilise une méthode physiologique de dosage qui repose sur la mesure de l'activité enzymatique du produit biologique étudié. L'activité enzymatique est définie comme étant le nombre de molécules de substrat transformé par une molécule d'enzyme par minute dans des conditions déterminées de température de pH et de concentration en substrat

On conçoit qu'une activité enzymatique est une notion arbitraire qui dépend essentiellement :

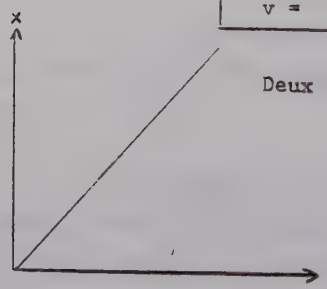
- du substrat utilisé,
- des conditions physico-chimiques de la réaction (température, pH, etc...),
- du critère d'activité coisi etc... .

C'est pourquoi, il importe dans l'expression des résultats d'indiquer tous les paramètres de la réaction.

2.1.2. Mesure de la vitesse d'une réaction enzymatique. Notion d'ordre d'une réaction.

La vitesse d'une réaction enzymatique est la quantité de substrat métabolisé par unité de temps. A chaque instant, la vitesse de la réaction (v) est proportionnelle à la quantité de substrat restant (s - x)

$$v = k\ (S - x)$$



cas d'une réaction d'ordre nul.

Deux cas peuvent se présenter :

- Si la quantité initiale de substrat (s) est en large excès par rapport à la quantité d'enzyme, on peut considérer comme négligeable la quantité de ce substrat qui disparait au cours de la réaction (x) par rapport à la quantité restante (S - x).

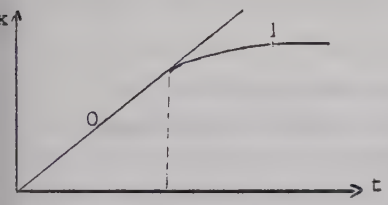
Dans ce cas, la relation entre la quantité x de substrat métabolisé et le temps t est une relation linéaire. On dit que la réaction est d'ordre nul.

Beaucoup de réactions enzymatiques, au début tout au moins et parfois pendant un temps assez long sont d'ordre nul.

- Cependant, si la réaction enzymatique se poursuit, la quantité x de substrat qui disparait n'est plus négligeable et la quantité (S - x) devient très différente de S.

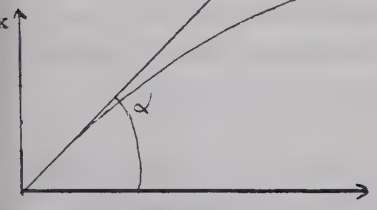
La vitesse de la réaction reste toujours proportionnelle à la quantité de substrat restant et l'on a $v = \frac{d x}{d t} = k (S - x)$

Puisque la quantité de substrat (S - x) diminue constamment, la vitesse de la réaction diminue également. La réaction est dite d'ordre 1.



Cas d'une réaction d'ordre nul au début, puis d'ordre 1.

L'expression graphique d'une cinétique d'ordre nul au début, puis d'ordre 1 par la suite, ce qui est un cas fréquent en enzymologie est la suivante.



Réaction d'emblée d'ordre 1

Si la réaction est d'emblée d'ordre 1, on détermine la vitesse initiale de la réaction au point limite représenté par l'origine ; la vitesse initiale de la réaction est définie par la tangente à l'origine de la courbe.

2.2. Préparation des extraits enzymatiques

En enzymologie digestive des poissons, les chercheurs se sont heurtés à des difficultés toutes particulières pour recueillir et utiliser un matériel d'étude valable. En effet, les sucs digestifs ne peuvent être obtenus qu'en petites quantités et l'emploi de fistules, si utilement réalisées sur les animaux terrestres ne peut être couramment envisagé chez les poissons. En outre, il est difficile d'isoler des extraits purs, non souillés par l'eau ou par les aliments et exempts de tout mélange avec un extrait de tissu voisin. Il est ainsi presque impossible d'éliminer entièrement les tissus conjonctifs et pancréatiques qui adhèrent aux coeca pyloriques. C'est notamment le cas

pour le loup dont le pancréas diffus est localisé dans le tissu mésentérique situé autour des coeca pyloriques et de l'intestin.

Dans le cadre de l'expérimentation, nous avons réalisé deux types de prélèvements :

- Un prélèvement de la muqueuse intestinale effectué par raclage au scalpel,
- un prélèvement de l'ensemble des coeca pyloriques préalablement débarrassés des nodules graisseux qui les entourent. Chaque prélèvement effectué le plus rapidement possible a été broyé à l'ultra-Turrax pendant 30 secondes à la vitesse maximum (20 000 tours/minute) dans de l'eau distillée glacée à raison de 30 ml d'eau par gramme de tissu frais. Les broyats sont conservés durant toute l'expérimentation dans de la glace pilée.

2.3. Dosage des protéines

Tous les dosages d'activités enzymatiques sont rapportés à la quantité de protéines comprises dans chaque extrait d'organe. Cette quantité est déterminée par la technique de Lowry et al 1951.

La présence de protéines est révélée au spectrocolorimètre à la fois grâce à leur pouvoir biurogène (sulfate de Cu en milieu alcalin) et par leur pouvoir réducteur des groupements tyrosyls et tryptophyls sur le réactif phosphotungsto-molybdique de Folin et Ciocalteu.

On solubilise les protéines (25 à 150 µg) dans 0,1 ml de NaOH. Après ajustement du volume à 1 ml, on rajoute 5 ml de solution cuproalcaline et 0,5 ml de réactif de Folin et Ciocalteu (dilué de moitié avec de l'eau distillé) La coloration qui se développe au bout de 40 minutes est lue au spectrocolorimètre à 660 nm.

Les densités optiques des échantillons sont comparées à celles d'une gamme étalon réalisée à partir d'une solution d'albumine de boeuf (250 µg/ml).

2.4. L'activité protéolytique globale

La technique utilisée est celle de Rick (1965) exposée dans l'ouvrage de Bergmeyer : "Méthods of enzymatic analysis".

A pH 9,0, les enzymes protéolytiques des extraits d'intestin (1 à 2 mg de protéine) ou de coeca pyloriques (0,5 à 1 mg de protéine) hydrolysent une solution d'hémoglobine dénaturée à 2 °/oo (2,5 ml). Après élimination des molécules protéiques en excès par précipitation trichloacétique (5 ml de TCA à 10 %) et centrifugation, les groupements tyrosyls et tryptophyls libérés par la réaction sont dosés colorimétriquement : aux 2,5 ml de surnageant obtenu, on ajoute 5 ml de NaOH 0,5 N et 1,5 ml de réactif de Folin et Ciocalte dilué de moitié avec de l'eau distillée.

Les densités optiques des échantillons, obtenues après lecture au spectrocolorimètre à 730 nm, sont comparées à celles d'une gamme étalon préparée avec de la tyrosine (10^{-3}M).

L'activité enzymatique est exprimée en micromoles de tyrosine libérée par milligramme de protéine et par minute. Nous avons pris soin de retrancher pour chaque valeur obtenue, la coloration provoquée en dehors de toute action enzymatique par le substrat et l'enzyme.

Lors de l'étude de l'action du pH sur l'activité protéolytique globale, nous avons modifié le pH du substrat par adjonction de NaOH N ou de HCl N jusqu'à obtention de la valeur désirée.

2.5. L'activité de la leucine aminopeptidase (LAP)

La technique utilisée est celle de Goldbarg et Rutenberg (1958).

A pH 7,2 (0,3 ml de tampon tris 0,1 M) et en présence de chlorure de zinc (0,5 ml Zn Cl_2 6mM) la LAP des extraits d'intestin (0,5 à 1 mg de protéine) et de coeca pyloriques (0,25 à 0,5 mg de protéine) hydrolyse la L leucyl naphtylamide HCl (Sigma) en L-leucine et en β naphtylamine. On arrête la réaction enzymatique en ajoutant 0,5 ml d'acide trichloracétique à 25°/oo . La β naphtylamine libérée forme en présence de nitrite de sodium (0,5 ml de Na NO_2 à 1 mg/ml) un réactif diazoté qui se colore en présence de N (1 - Naphtyl) - Ethylène-diamine (réactif Sigma). La coloration de la solution finale révélée au spectrocolorimètre à 590 nm donne, par comparaison avec une gamme d'étalonnage la concentration en β naphtylamine de l'échantillon. Nous avons pris soin, comme pour tous les autres dosages, de retrancher pour chaque activité la coloration provoquée en dehors de toute action enzymatique par le substrat et l'enzyme.

L'activité enzymatique est exprimée en micromoles de β naphtylamine libérées par milligramme de protéines et par minute.

Lors de l'étude de l'action du pH sur l'activité leucine aminopeptidasique, nous avons modifié le pH du tampon tris tant qu'il a été possible de le faire (entre 5,2 et 8,6). Pour les pH plus alcalins, nous avons utilisé un tampon glycocolle.

2.6. L'activité de la glycylglycine dipeptidase (GGDP) :

La technique utilisée est celle de Grassman et Heyde (1930) modifiée par Smith et al (1950) et exposée par Wust (1965) dans l'ouvrage de Bergmeyer " Méthods of enzymatic analysis ".

A pH 7,8 (1,150 ml de tampon tris 0,025 M) et en présence de chlorure de cobalt (0,25 ml à 0,01 M) , la GGDP des extraits d'intestin et de coeca pyloriques (0,5 à 1mg de protéine pour chaque extrait d'organe) hydrolyse la glycylglycine (1 ml de substrat à 25 mM). Après arrêt de la réaction enzymatique par adjonction de 2 ml d'acide trichloacétique à 10 % et centrifugation de la solution obtenue, la glycine libérée est dosée par la méthode colorimétrique de Moore et Stein (1954) : à 0,2 ml de surnageant, on ajoute 0,5 ml de réactif à la nihydrine. Le mélange obtenu est placé pendant 20 minutes au bain-marie bouillant puis refroidi. 5 ml d'une solution de dilution (éther monométhylique de l'éthylène glycol dilué de moitié dans de l'eau distillée) sont alors rajoutés. On détermine la densité optique de la solution finale colorée en bleu au spectrocolorimètre à 570 nm.

Les densités optiques des échantillons sont comparées à celle d'une gamme étalon réalisée à partir d'une solution de glycocolle (2 à 6 µg/ml).

L'activité enzymatique est exprimée en micromoles de glycylglycine hydrolysée par milligramme de protéine et par minute. Nous avons pris soin de retrancher pour chaque valeur obtenue, la coloration provoquée en dehors de toute action enzymatique par le substrat et l'enzyme.

Lors de l'étude de l'action du pH sur l'activité glycylglycine dipeptidasique, nous avons modifié le pH du tampon tris jusqu'à obtention de la valeur désirée.

2.7. L'activité ∝ amylasique

La technique utilisée est une adaptation de celle de Street (1965) exposée dans l'ouvrage de Bergmeyer " methods of enzymatic analysis ".

Le substrat est une solution d'amylose à 0,1 % (1 ml) tamponnée à pH 7,4 par 2 ml de tampon phosphate 0,5 M . En présence de réactif de lugol (dilué au 1/5), l'amylose développe une coloration bleue. On détermine théoriquement l'activité ∝ amylasique en mesurant au spectrocolorimètre (660 nm) la diminution de l'intensité de la coloration initiale de la solution d'amylose. En pratique, l'apparition d'une coloration parasite dûe à la libération de chaînes de dextrines rend difficile l'appréciation exacte de la quantité de substrat hydrolysé. C'est la raison pour laquelle, nous avons exprimé, comme la plupart des auteurs, l'activité ∝ amylasique des extraits d'intestin et de coeca pyloriques (1 à 2 mg de protéines pour chacun des extraits) par les variations relatives de densité optique rapportées au milligramme de protéine contenue dans chaque extrait et à la minute.

$$1 \text{ unité} = \frac{\text{Do départ - Do finale}}{\text{Do départ x Protéines x temps}}$$

Lors de l'étude de l'action du pH sur l'activité ∝ amylasique, nous avons modifié le pH du tampon phosphate tant qu'il a été possible de le faire (entre pH 5,0 et pH 8,2). Pour les pH plus alcalins, nous avons utilisé un tampon glycocolle.

2.8. Les activités de la maltase, la tréhalase, la sucrase et la lactase

La technique utilisée est celle de Dalquist (1964) modifiée par Lloyd et Whelan (1969).

Différents substrats (maltose, tréhalose, sucrose et lactose 56 mM) préparés dans du tampon phosphate 0,1 M sont hydrolysés à pH 6,5 par les enzymes correspondantes des extraits d'intestin et de coeca pyloriques (0,1 à 0,3 mg de protéines pour chaque extrait d'organe). La réaction enzymatique est stoppée par chauffage à 100°C pendant trois minutes. Les quantités de glucose libérées pendant la réaction sont déterminées par la méthode de Huggett et Nixon (1957)

$$\text{Glucose} + H_2O \xrightarrow{\text{Glucose oxydase}} \text{Acide gluconique} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{Peroxydase}} H_2O + O.$$

L'oxygène libéré forme avec l'ortho-dianisidine un complexe jaune dont la coloration révélée au spectrocolorimètre à 520 nm donne par comparaison avec une gamme d'étalonnage, la concentration en glucose de l'échantillon. Nous avons pris soin de retrancher pour chaque activité la coloration provoquée en dehors de toute action enzymatique par le substrat et l'enzyme.

L'activité des différentes disaccharisases est exprimée en microgrammes de glucose libéré par milligrammes de protéine et par minute.

La recherche de l'action du pH n'a été effectuée que sur l'activité de la maltase qui est la plus importante de toutes les disaccharidases étudiées. Les variations de pH ont été obtenues en ajoutant au tampon maleate plus ou moins de NaOH N.

2.9. L'activité de la phosphatase alcaline non spécifique

La technique utilisée est celle de Eichholtz (1967).

A pH 10,5 (1 ml de tampon glycine 0,1 M) et en présence de chlorure de cobalt (25 mM) la phosphatase alcaline des extraits d'intestin ou de coeca pyloriques (50 à 100 µg de protéines pour chaque extrait d'organe) est capable de libérer l'acide orthophosphorique du p-nitrophényl phosphate. Le p-nitrophénol libéré est dosé colorimétriquement à 410 nm grâce à la teinte jaune qu'il donne en milieu alcalin (adjonction de 10 ml de NaOH 0,02 N qui arrête également la réaction enzymatique).

Les densités optiques des échantillons sont comparées à celles d'une gamme étalon réalisée à partir d'une solution de p-nitrophénol (0,5 µmoles/ml).

L'activité enzymatique est exprimée en micromoles de p-nitrophénol libéré par milligramme de protéines et par minute. Nous avons pris soin de retrancher pour chaque valeur obtenue, la coloration provoquée en dehors de toute action enzymatique par le substrat et l'enzyme.

Lors de l'étude de l'action du pH sur l'activité de la phosphatase alcaline, nous avons modifié le pH du tampon glycocolle avec de la soude N.

III.- RESULTATS

3.1. Evolution du pH dans le fluide intestinal après un repas

Organe	Temps écoulé après l'ingestion d'un repas				
	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h
Estomac	2,1-2,3	2,5-2,7	5,5-5,8	6,1-6,4	6,4-6,7
Intestin antérieur	6,7-7,0	7,3-7,6	7,4-7,6	7,6-7,9	7,9-8,0
postérieur	7,6	7,8-7,9	7,9-8,1	8,3-8,5	8,3-8,5

D'après E. Alliot et al (1974)

E. Alliot et al (1974) ont révélé plusieurs valeurs du pH dans les différentes portions du tube digestif chez des loups adultes nourris et conservés en laboratoire.

L'examen des résultats rapportés dans le tableau montre qu'il existe une évolution du pH consécutive au repas. Dans les premières heures qui suivent l'ingestion, le pH du suc gastrique s'abaisse aux environs de 2,0. Dans la partie duodénale, il est proche de 7,0 ; il devient de plus en plus alcalin vers la zone postérieure du tube digestif où il est compris entre 7,6 et 8,0. 48 h après un repas, dans l'estomac, le pH se situe entre 6,0 et 7,0 ; au niveau des coeca pyloriques ainsi que dans le fluide intestinal, il varie aux alentours de 8,0.

3.2. Etude des enzymes protéolytiques

3.2.1. L'activité protéolytique globale

L'activité protéolytique globale des extraits de coeca pyloriques et d'intestin a été étudiée à pH 9,0 et à 37°C, avec l'hémoglobine comme substrat (figure n° 6).

Le maximum d'hydrolyse de l'hémoglobine est obtenu avec les extraits de coeca pyloriques. La muqueuse intestinale ne présente en comparaison qu'une

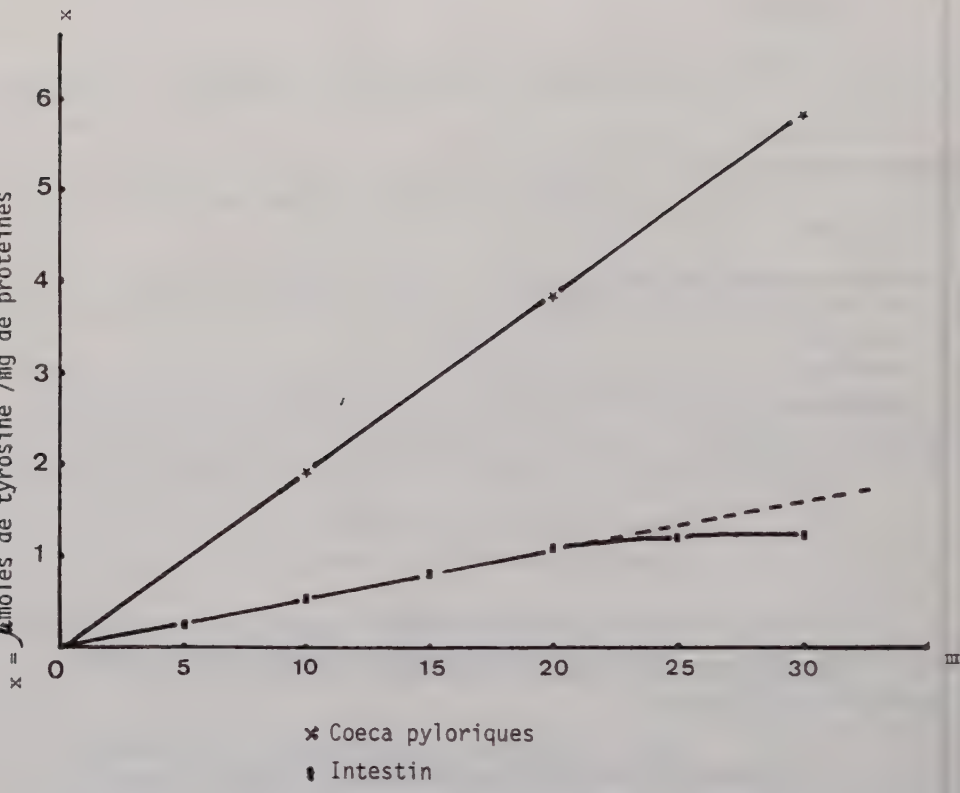


FIGURE 6.- Cinétique de l'activité protéolytique globale
- Substrat hémoglobine
- pH 9,0
- Température 37° C

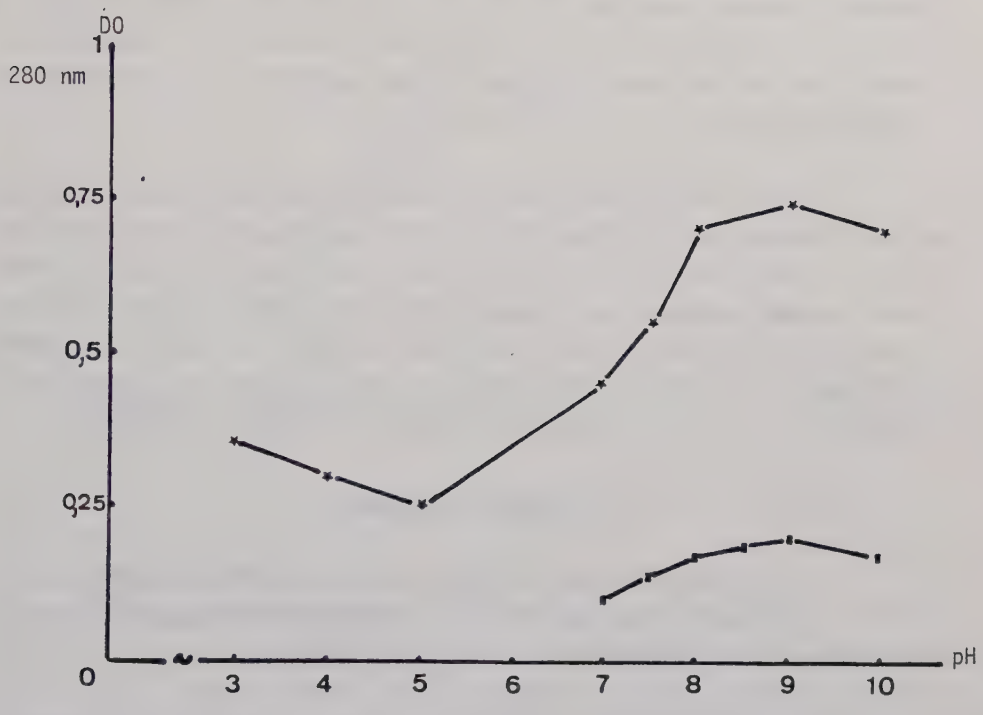


FIGURE 7.- Influence du pH sur l'activité protéolytique globale
- Substrat hémoglobine
- Température 25° C

D'après E.ALLIOT et AL (1974)

activité environ cinq fois plus faible. La cinétique d'activité des extraits de coeca pyloriques est linéaire pendant les trente minutes de l'expérience. La quantité initiale de substrat est donc en large excès par rapport à la quantité d'enzyme disponible. Par contre, la cinétique obtenue avec les extraits d'intestin s'infléchit au bout de 20 minutes : un déficit en substrat ne pouvant être pris en compte ici, nous devons admettre l'altération d'une ou plusieurs enzymes au cours de la réaction.

Les conditions optimales de pH pour l'activité protéolytique globale ont été étudiées par E. Alliot et al (1974). Les résultats montrent qu'il existe au niveau de l'intestin et des coeca pyloriques un groupe d'enzymes protéolytiques présentant un optimum de pH à 25°C compris entre 8,0 et 10,0 (figure n°7). Au niveau des coeca pyloriques s'exerce une activité enzymatique située dans la zone acide, entre pH 3,0 et pH 7,0. Enfin, il apparait que l'effet du pH sur l'activité protéolytique de l'intestin est limité.

3.2.2. L'activité trypsique

L'activité vis à vis du TAME (p Tosyl-L-arginine méthyl ester) substrat spécifique de la trypsine, des extraits de coeca pyloriques et d'intestin, a été étudiée par E. Alliot et al (1974).

A pH 8,0 à 25°C, le maximum d'hydrolyse du substrat est obtenu avec les extraits de coeca pyloriques. La muqueuse intestinale ne présente en comparaison qu'une activité environ dix fois plus faible. Lorsqu'on ajoute des quantités croissantes de facteur antitrypsique du soja dans le milieu réactionnel, l'hydrolyse de TAME est ralentie, voire presque totalement arrêtée. Ce phénomène tend à démontrer que cette enzyme est de nature analogue à la trypsine des mammifères.

L'activité de ces deux extraits d'organes a été comparée à l'activité de quantités connues de trypsine de pancréas de boeuf (Kochlight et Co 5222 t). Un gramme de coecum pylorique en poids frais présente à pH 8,0 et à 25°C, une activité équivalente à 4,68 mg de trypsine purifiée. Dans les mêmes conditions, les extraits d'intestin présentent, par gramme de poids frais, des activités équivalentes à 300-600 µg de trypsine de boeuf.

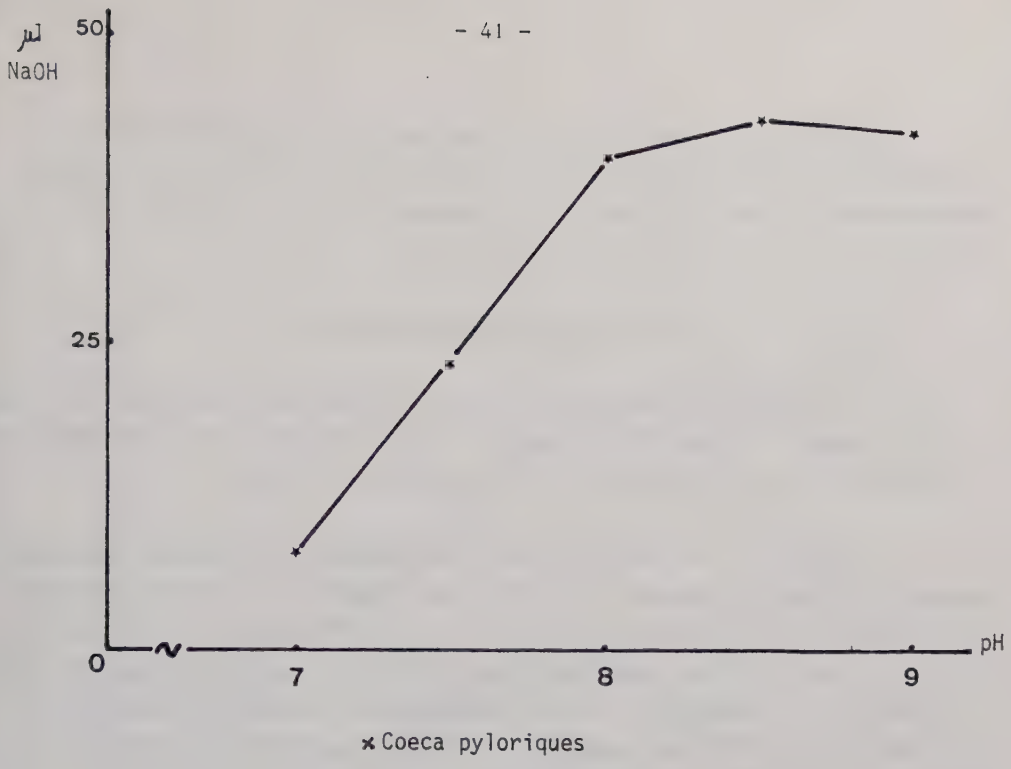


FIGURE 8.- Influence du pH sur l'activité trypsique
- Substrat TAME
- Température 25° C

D'après E.ALLIOT et AL (1974)

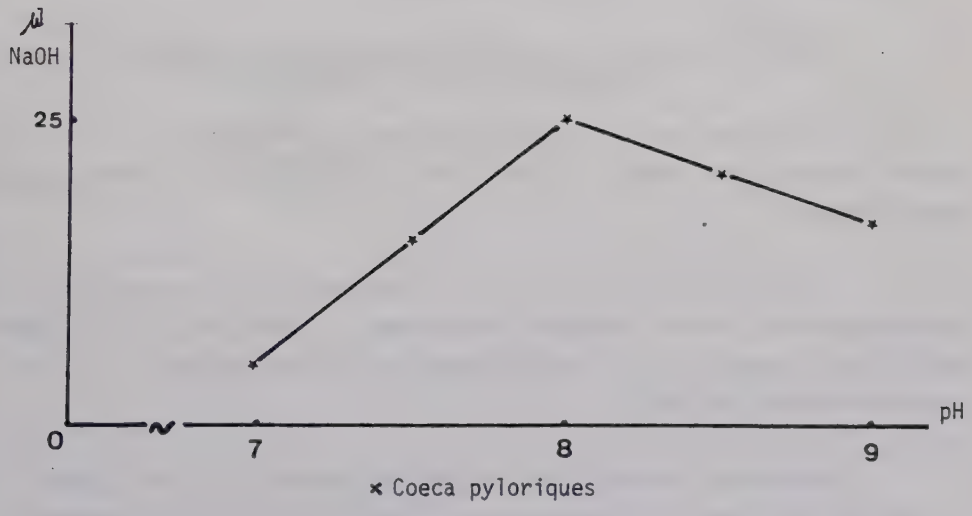


FIGURE 9.- Influence du pH sur l'activité chymotrypsique
- Substrat BTEE
- Température 25° C

D'après E.ALLIOT et AL (1974)

A 25°C, l'optimum de pH pour les extraits de coeca pyloriques se situe entre 8,0 et 8,2 (figure n°8). La décroissance de l'activité s'effectue régulièrement de part et d'autre de ce maximum. L'activité minimale est obtenue à pH 7,0 dans la gamme de pH étudiée.

3.2.3. L'activité chymotrypsique

L'activité des extraits de coeca pyloriques et d'intestin, vis à vis du BTEE (Benzoyl Tyrosine ethyl ester), susbtrat spécifique de la chymotrypsine, a été étudiée à pH 8,0 et à 25°C par E. Alliot et al (1974).

Comme pour la trypsine, l'activité maximale est observée pour les extraits de coeca pyloriques. L'activité des extraits a été comparée à celle qu'exerce la chymotrypsine de pancréas de boeuf (Calbiochem). A pH 8,0 et à 25° C, l'activité d'un gramme (en poids frais) de coecum pylorique équivaut à celle qui est obtenue avec 3,12 mg de chymotrypsine purifié. Au niveau de l'intestin, l'activité par gramme (en poids frais), beaucoup plus faible correspond à 160-380 μg de chymotrypsine de boeuf.

A 25°C, l'optimum de pH pour les extraits de coeca pyloriques se situe entre 8,0 et 8,2 (figure n°9). La décroissance de l'activité s'effectue régulièrement de part et d'autre de ce maximum. L'activité minimale est obtenue à pH 7,0 dans la gamme de pH étudiée.

3.2.4. Les activités carboxypeptidasiques

Ces enzymes ont été mises en évidence par E.Alliot et al (1974) à partir d'extraits de coeca pyloriques, avec l'acide hippuryl L phénylallactique comme substrat.

L'activité de ces extraits a été comparée à celle obtenue avec de la carboxypeptidase de boeuf purifiée (Calbiochem). A pH 8,0 et à 25°C, l'activité mesurée par gramme de poids frais équivaut à celle obtenue avec 1,24 mg de carboxypeptidase purifiée.

Lorsque les extraits sont incubés une heure à 20°C avec l'EDTA (acide éthylène diamine tétracétique) (10^{-2}M), 80 à 90 p.100 de l'activité est inhibée, laissant penser qu'il s'agit bien d'une métalloenzyme.

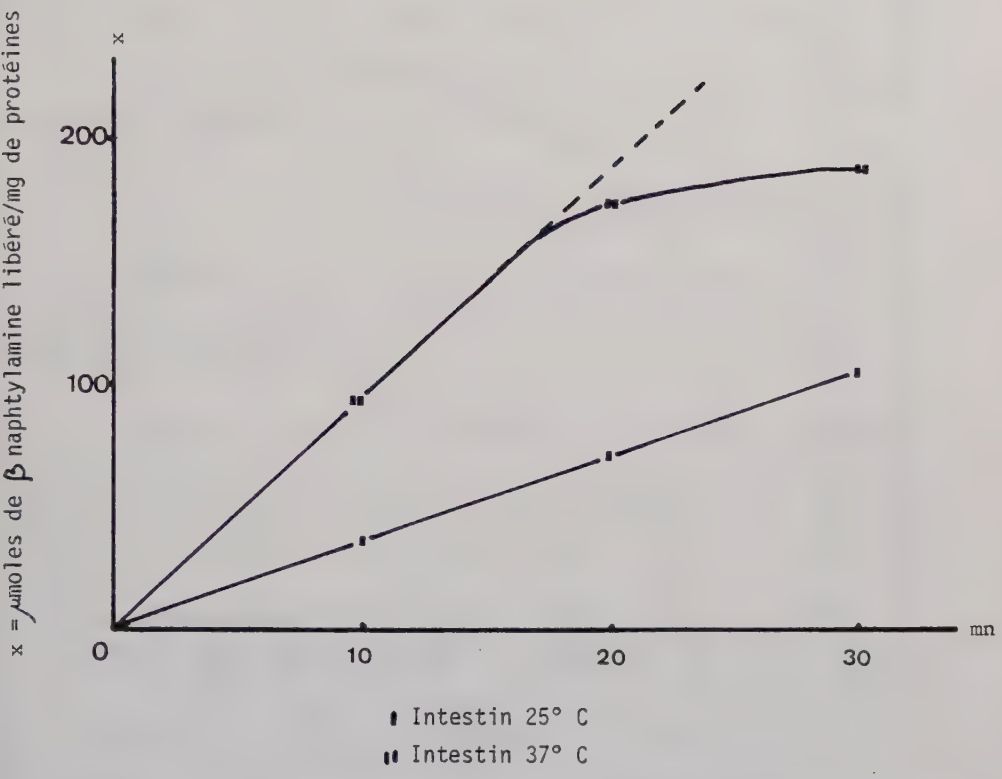


FIGURE 10.- Cinétique de l'activité de la Leucine aminopeptidase (LAP)
- Substrat : L leucyl naphtylamine
- pH 7,2
- Températures 25° C et 37° C

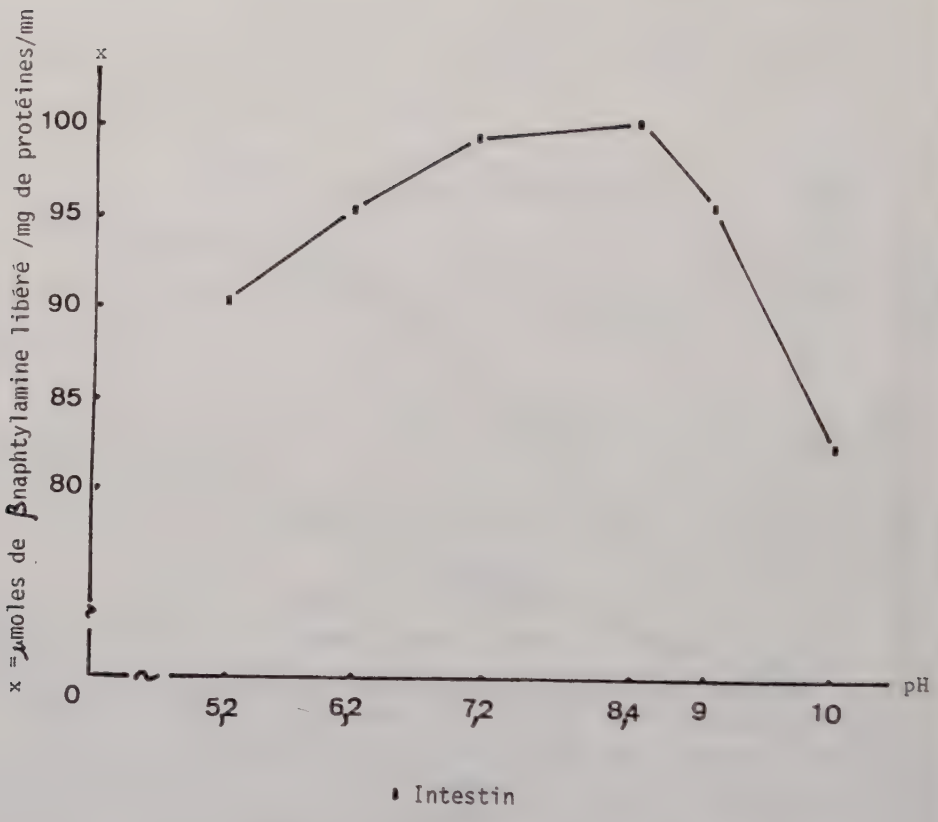


FIGURE 11.- Influence du pH sur l'activité de leucine amino peptidase (LAP)
- Substrat L leucyl naphtylamine
- Température 37° C

La présence d'une enzyme analogue à la carboxypeptidase B a été recherchée. Et on a pu montrer que les extraits de coeca pyloriques hydrolysaient l'hippuryl L arginine, substrat spécifique de cette enzyme.

E. Alliot et al (1974) ont observé qu'à 25°C, l'activité des extraits de coeca pyloriques était plus élevée à pH 8,5 qu'à pH 8,0.

3.2.5. L'activité de la leucine aminopeptidase (LAP)

L'activité de la LAP a été étudiée à partir d'extraits d'intestin et de coeca pyloriques à 37°C et à pH 7,2 avec la L leucyl β naphtyl amide (SIGMA) comme substrat (figure n°10).

Au niveau de l'intestin, l'enzyme libère 9,3 µmoles de β naphtylamine par mg de protéine et par mn alors qu'au niveau des coeca pyloriques l'hydrolyse ne produit que 3,2 µmoles de β naphtylamine par mg de protéine et par mn. L'activité de la LAP est donc environ trois fois plus élevée dans l'intestin.

Cette activité peptidasique est influencée par la température. A 25° C, l'activité de la LAP au niveau de l'intestin est moins élevée qu'à 37°C. Toutefois pour la plus forte température, on observe une inflexion de la cinétique d'activité au cours du temps. Ce phénomène pourrait traduire qu'une inactivation de l'enzyme apparait au cours du temps lorsque la température est trop élevée.

A 37°C, la LAP des extraits d'intestin présente un maximum d'activité pour des valeurs du pH comprises entre 8,0 et 8,5 (figure n°11).Entre pH 5,2 et pH 8,4, l'activité augmente lentement quand le pH s'accroit. Dans la zone alcaline entre pH 8,4 et pH 10,0, cette activité décroit au contraire très rapidement.

3.2.6. L'activité de la glycylglycine dipeptidase (GGDP)

L'activité de la GGDP des extraits de coeca pyloriques et d'intestin a été étudiée à pH 7,8 et à la température de 37°C avec la glycylglycine comme substrat (figure n° 12).

Le maximum d'hydrolyse de la glycylglycine est obtenu avec les extraits d'intestin. Les coeca pyloriques présentent en comparaison une activité environ deux fois plus faible. Avec les deux extraits, la cinétique

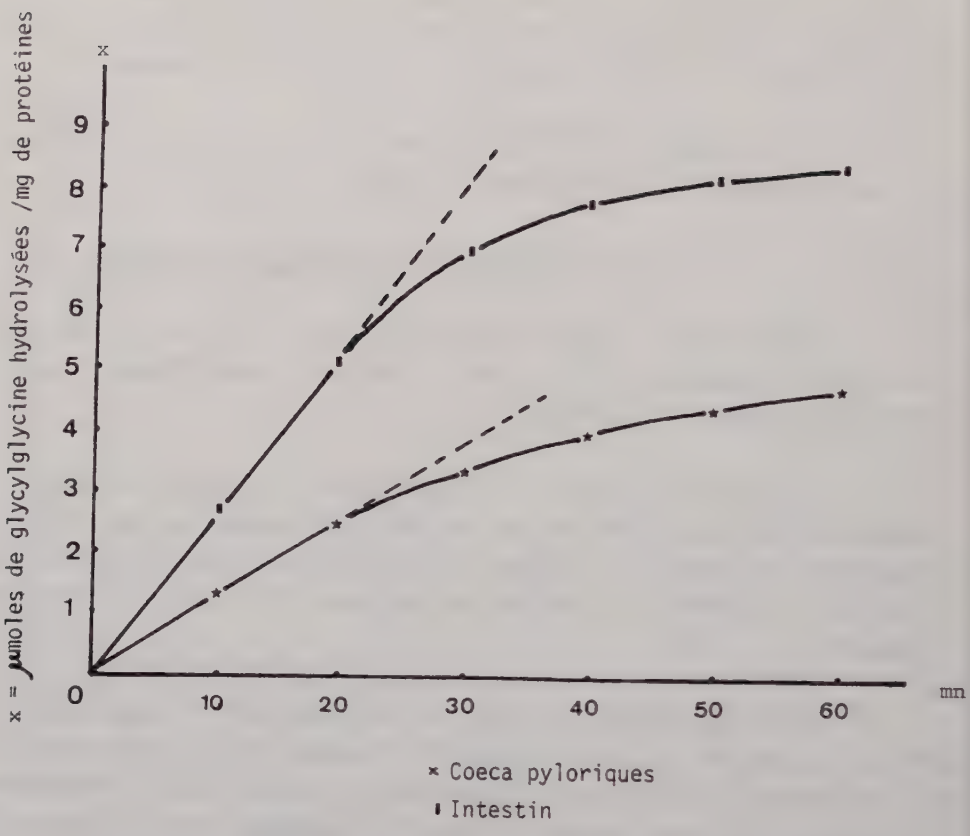


FIGURE 12.- Cinétique de l'activité de la glycylglycine dipeptidase ((
- Substrat glycylglycine
- pH 7,8
- Température 37° C

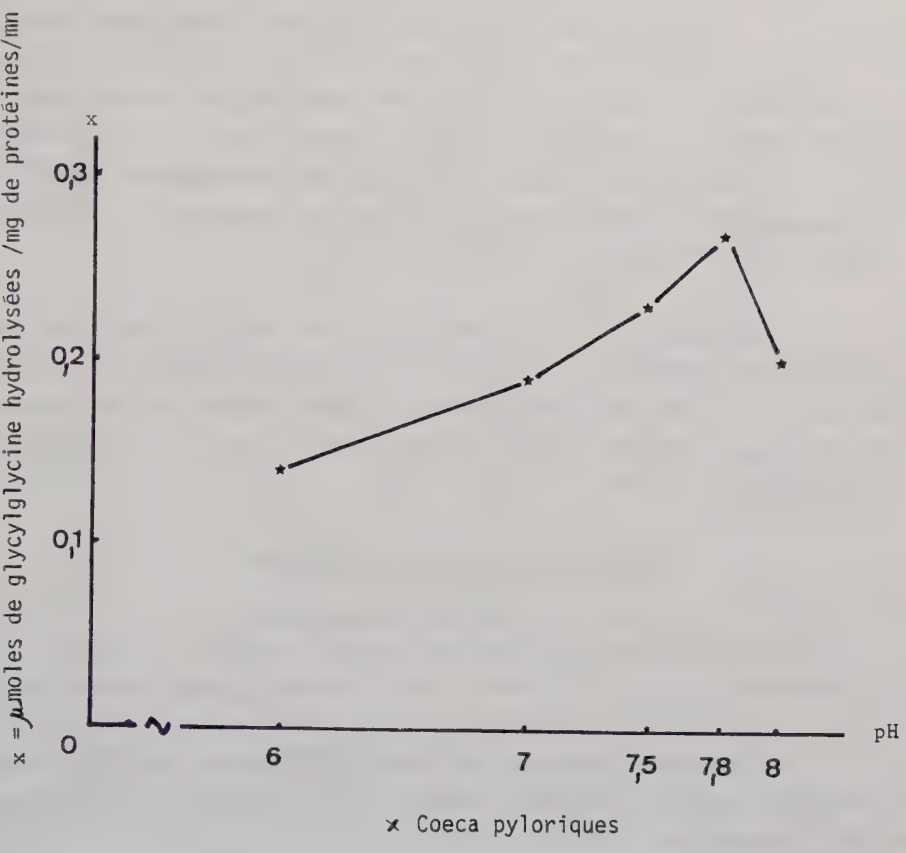


FIGURE 13.- Influence du pH sur l'activité de la glycylglycine dipeptidase (GGDP)
- Substrat glycylglycine
- Température 37° C

d'activité n'est plus linéaire après vingt minutes d'expérience. Cette observation peut s'expliquer, comme dans le cas de la LAP par une inactivation thermique de l'enzyme. Toutefois, les quantités de substrat diminuant progressivement au cours de l'incubation, peuvent constituer à la longue un facteur de limitation de l'activité de l'enzyme. Pratiquement, il ne convient pas de prolonger les expériences au delà de vingt minutes à 37°C ; condition que nous avons retenue pour étudier les effets du pH.

Comme pour la LAP, l'effet du pH a été étudié à partir des extraits d'intestin qui présentent l'activité la plus élevée. Différents pH compris entre 6,0 et 8,0 ont été testés à 37°C. La GGDP présente un pic d'activité très marqué au voisinage de pH 7,8. De part et d'autre de cette valeur, l'activité chute fortement. (figure n°13).

3.3. Etude des enzymes glucidolytiques

3.3.1. L'activité α amylasique

L'activité amylolytique des extraits de coeca pyloriques et d'intestin a été étudiée à pH 7,4 et à 37°C avec l'amylase comme substrat (figure n°14).

Le maximum d'hydrolyse de l'amylose est obtenu avec les extraits de coeca pyloriques. La muqueuse intestinale ne présente en comparaison qu'une activité environ huit fois plus faible.

Après vingt minutes d'incubation, la cinétique d'activité de l'enzyme s'infléchit de manière très sensible. Comme pour la GGDP ou la LAP, chez lesquelles un phénomène analogue avait été observé, une inactivation progressive de l'enzyme pourrait intervenir au cours du temps.

A 37°C, l'amylase des extraits de coeca pyloriques présente un maximum d'activité à pH 7,0 (figure n°15).Dans la zone acide à pH 6,0, l'activité reste importante. Dans la zone alcaline, par contre, l'activité amylolytique décroit très rapidement : la valeur minimale enregistrée dans la gamme de pH étudiée se situant à pH 9,0.

3.3.2. L'activité de la maltase

L'activité de la maltase des extraits d'intestin et de coeca pyloriques a été étudiée à pH 6,5 et à 37°C avec le maltose comme substrat (figure n°16).

Le maximum d'hydrolyse du maltose est obtenu avec les extraits d'intestin (618,2 µg de glucose libéré par mg de protéine et par mn).

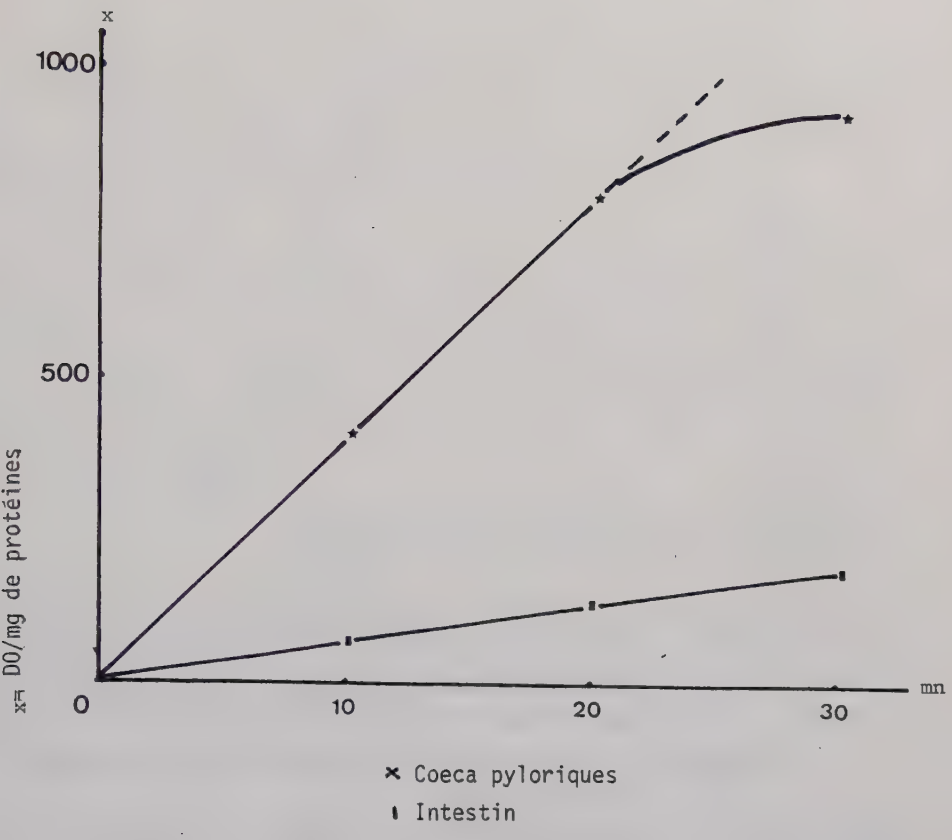


FIGURE 14.- Cinétique de l'activité de l'∝ amylase
- Substrat amylose
- pH 7,4
- Température 37° C

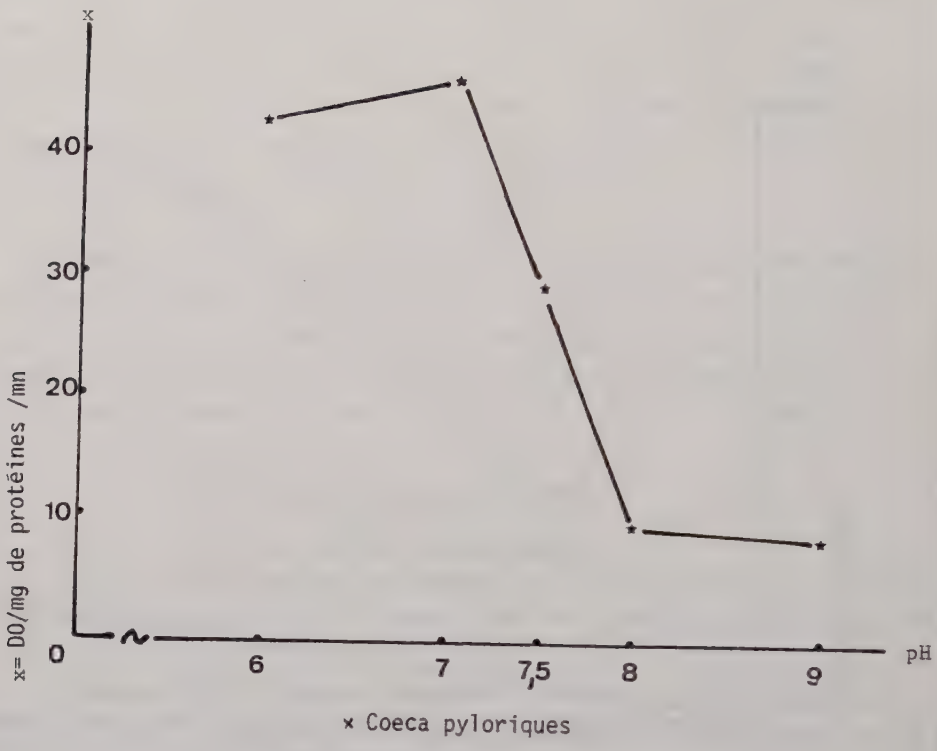


FIGURE 15.- Influence du pH sur l'activité de l'α amylase
- Substrat amylose
- Température 37° C

Les coeca pyloriques présentent en comparaison une activité environ deux fois plus faible (262,5 µg de glucose libéré par mg de protéine et par mn).

L'activité de cette enzyme est influencée par la température du milieu d'incubation. Ainsi, à 25°C, elle est plus faible qu'à 37°C. Toutefois à 37°C, la cinétique d'activité s'infléchit assez rapidement après quinze minutes d'incubation. Ceci pourrait traduire qu'une inactivation de l'enzyme apparait au cours du temps lorsque la température s'élève trop.

Les conditions optimales de pH pour l'activité de la maltase ont été étudiées à partir des extraits de coeca pyloriques et d'intestin (figure n°17 Dans ces extraits, la maltase présente un pH optimum d'action compris entre 6,0 et 6,5. Entre pH 5,2 et pH 6,2, l'activité décroit rapidement. Au dessous de pH 6,2, on observe une décroissance progressive de l'activité de cette enzyme jusqu'à un minimum obtenu à pH 10,0.

3.3.3. Les activités de la sucrase, la tréhalase et la lactase.

Les activités de la sucrase, la tréhalase et la lactase des extraits de coeca pyloriques et d'intestin ont été étudiées à pH 6,5 et à 37°C en présence de leurs substrats spécifiques le sucrose (saccharose), le tréhalose et le lactose.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau ci-dessous :

activité [x] / organe	maltase	sucrase	tréhalase	lactase
Intestin	618,2	164,2	133,3	0
Coeca pyloriques	262,5	202,2	90,0	0

[x] Les activités sont exprimées en µg de glucose libéré par mg de protéine et par mn.

Aucune activité lactasique n'a été détectée dans les extraits d'intestin ou de coeca pyloriques.

Au niveau de l'intestin, les activités de la sucrase et de la tréhalase représentent à peu près respectivement le quart et le cinquième de l'activité de la maltase.

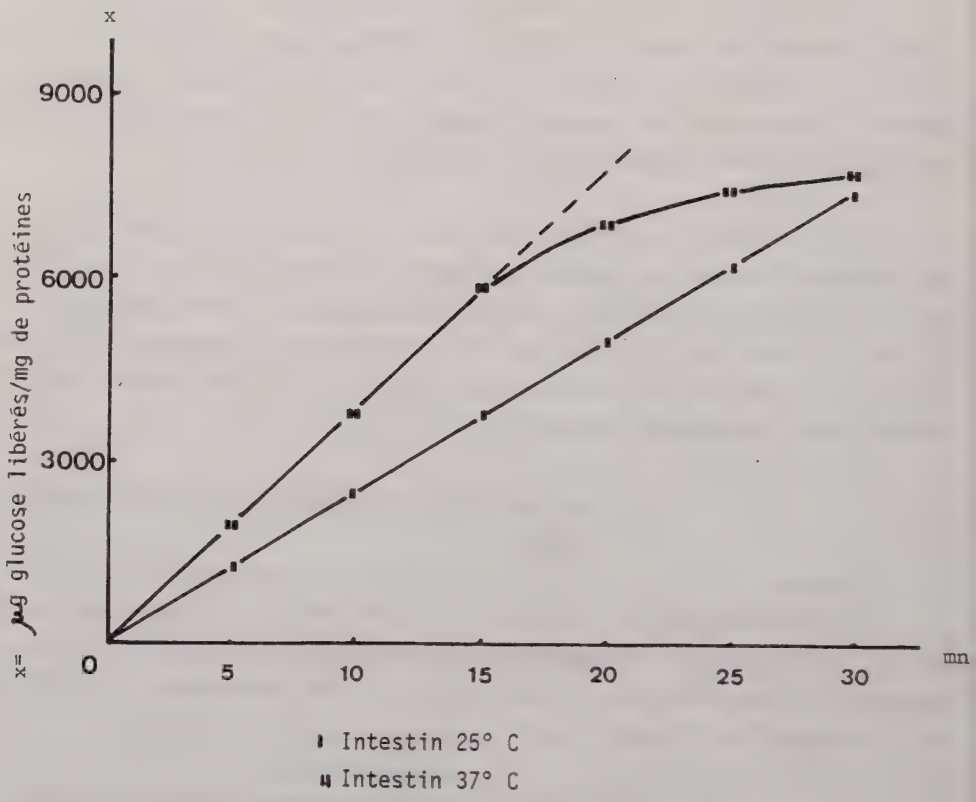


FIGURE 16.- Cinétique de l'activité de la maltase
- Substrat maltase
- pH 6,5
- Températures 25° C et 37° C

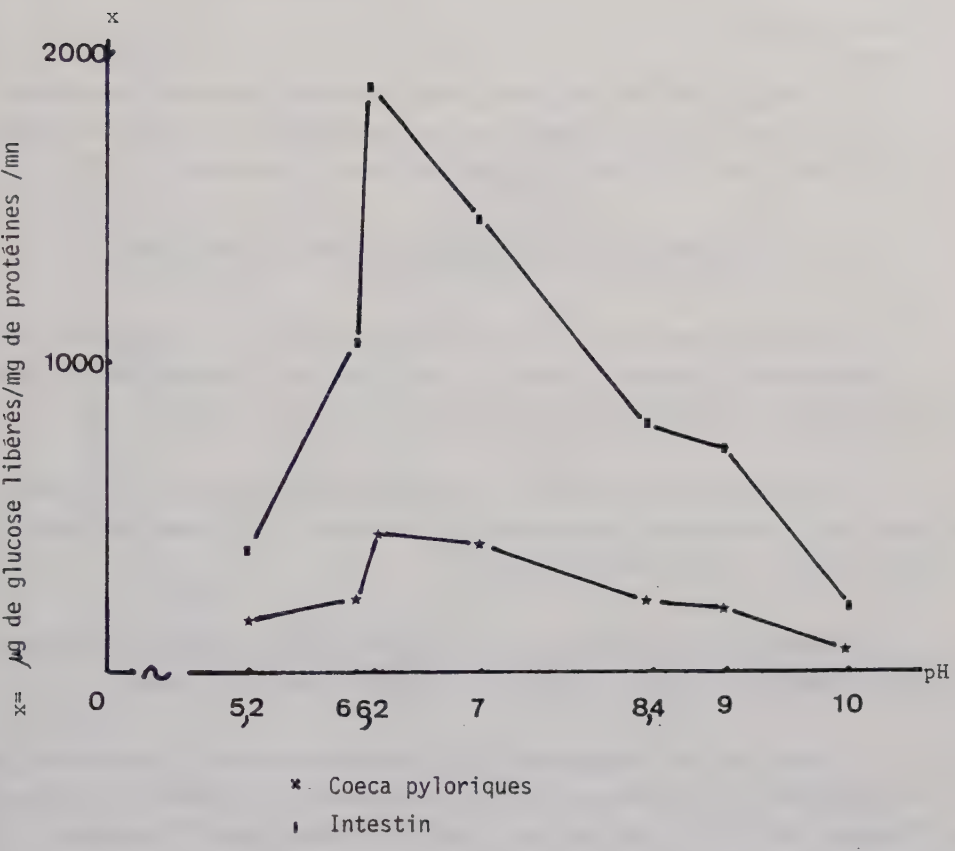


FIGURE 17.- Influence du pH sur l'activité de la maltase
- Substrat amylose
- Température 37° C

Au niveau des coeca pyloriques, l'activité de la maltase est légèrement supérieure à celle de la sucrase et elle représente environ le triple de celle de la tréhalase.

L'activité sucrase des coeca pyloriques est légèrement supérieure à celle de l'intestin. Pour la tréhalase, au contraire, l'activité enzymatique est plus élevée dans l'intestin que dans les coeca pyloriques.

3.4. Etude de la phosphatase alcaline non spécifique

L'activité des extraits de coeca pyloriques et d'intestin, vis à vis du P-nitrophénylphosphate, substrat spécifique de la phosphatase alcaline non spécifique a été étudiée à pH 10,0 et à 37°C (figure n°18)

Les cinétiques représentant l'évolution de cette activité au cours du temps sont pratiquement comparables et indiquent que l'enzyme présente la même activité dans les deux extraits.

Comme pour les autres enzymes étudiées jusqu'à présent, on observe un fléchissement de l'activité après un certain temps d'incubation.

L'effet du pH a été étudié à 37°C sur des extraits d'intestin et de coeca pyloriques. La phosphatase alcaline non spécifique présente un optimum de pH strict égal à 10,0. De part et d'autre de cette valeur, l'activité diminue fortement (figure n°19).

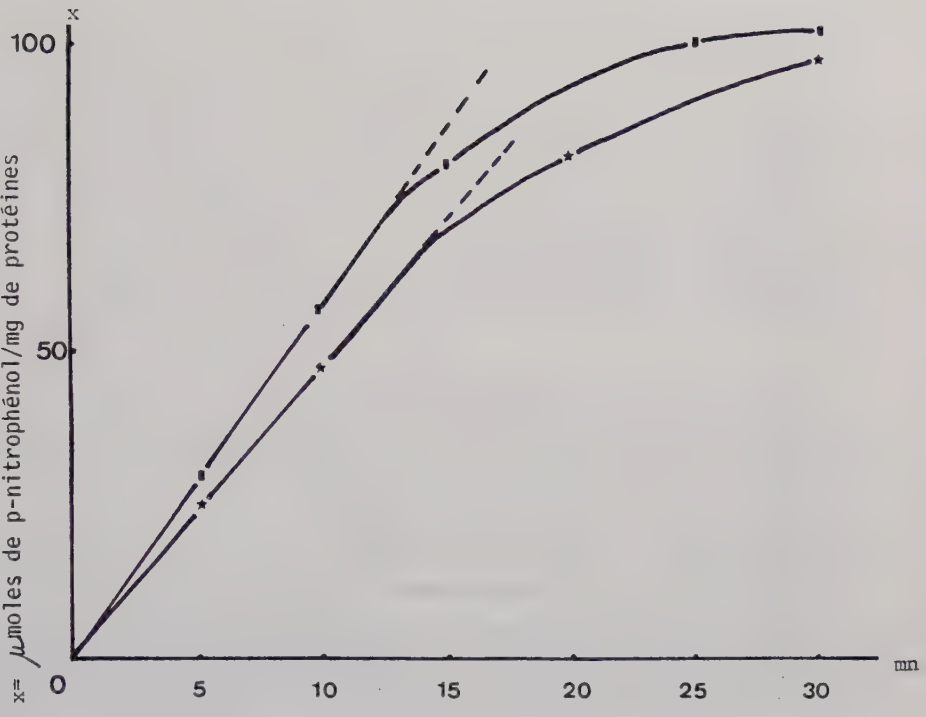


FIGURE 18.- Cinétique de l'activité de la phosphatase alcaline non spécifique
- Substrat p-nitrophénylphosphate
- pH 10,5
- Température 37° C

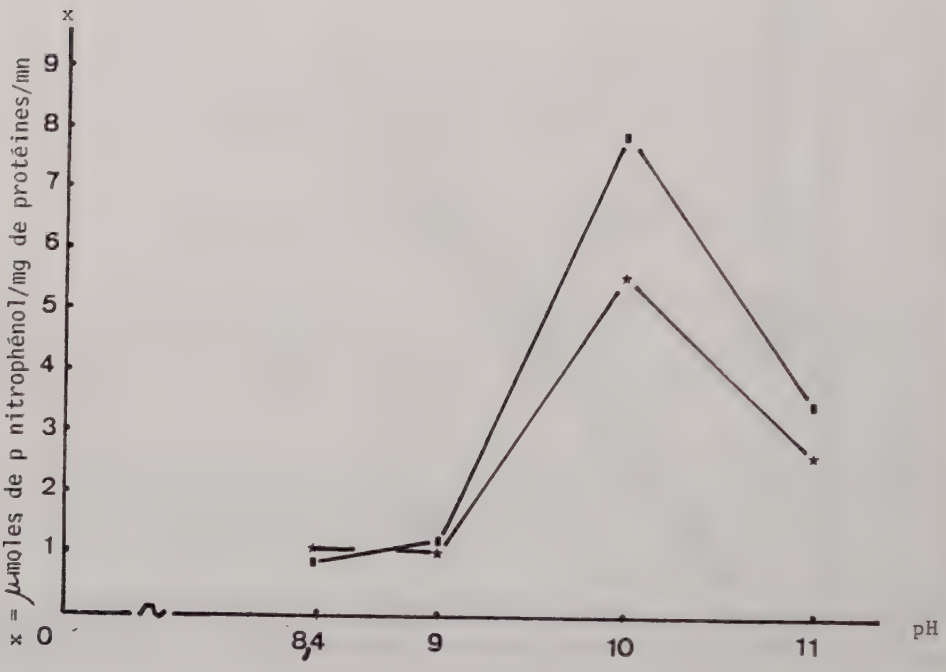


FIGURE 19.- Influence du pH sur l'activité de la phosphatase alcaline non spécifique
- Substrat p-nitrophénylphosphate
- Température 37° C

IV.- DISCUSSION

Au cours de ce travail expérimental réalisé à l'Institut MICHEL PACHA (83500 Tamaris sur mer - France -), nous avons mis en évidence plusieurs groupes d'enzymes responsables de la digestion des protéines, des glucides et des esters phosphoriques au niveau des coeca pyloriques et de l'intestin du loup. Les observations limitées en raison de la trop courte durée des stages de laboratoire suivis à l'Institut ont porté sur un nombre restreint d'animaux (trois loups en moyenne par enzyme) ; ceci explique qu'aucune analyse statistique de résultats n'a été effectuée, contrairement à ce qui se pratique généralement dans ce type de recherche.

Nous avons évalué l'activité protéolytique globale en utilisant l'hémoglobine comme substrat. Cette activité est beaucoup plus importante au niveau des coeca pyloriques. Cette constatation recoupe les conclusions de travaux parallèles menés par une autre équipe (E. Alliot et al 1974), dont nous avons rapporté les résultats ; elles démontrent que l'activité trypsique, chymotrypsique et carboxypeptidasique des coeca pyloriques du loup est particulièrement élevée. Nous avons également observé que les coeca pyloriques étaient riches en une autre enzyme responsable de l'hydrolyse des glucides. Il s'agit de l'α amylase qui est par ailleurs pratiquement absente du reste de l'intestin.

La présence de ces deux enzymes, habituellement sécrétées par le pancréas pose le problème de la localisation de cet organe chez le loup. Il n'existe pas de pancréas individualisé chez cette espèce. La mise en évidence de ces sécrétions protéolytiques et de l'α amylase au niveau des coeca pyloriques conduirait alors à penser que le pancréas serait présent à l'état diffus au sein des structures coecales, comme chez beaucoup d'espèces ne possédant pas de pancréas différencié. Il serait responsable de l'élaboration de ces enzymes qui gagneraient ensuite la lumière intestinale.

La possibilité d'une sécrétion de ces enzymes sous une forme inactive, au moins en ce qui concerne les enzymes protéolytiques, doit être envisagée. Cette situation est commune à la plupart des mammifères. Chez le loup, il est difficile de caractériser directement l'enzyme responsable de l'activation de la pro-enzyme inactive car le pancréas est diffus. Néanmoins une vérification indirecte de l'existence d'une enzyme activatrice ayant les mêmes propriétés que l'entérokinase des mammifères a été tentée au laboratoire (résultats non publiés). Elle consiste en la réalisation d'essais croisés

destinés à préciser si des extraits de pancréas d'anguille, dont on sait par ailleurs qu'ils renferment des protéases inactives, peuvent être activés par des broyats de coecum ou d'intestin de loup. Les expériences ont montré qu'une pareille activation était possible car l'hydrolyse de l'hémoglobine qui n'a pas lieu en présence d'extraits bruts de pancréas d'anguille, est très importante si des extraits de coecum ou d'intestin de loup sont ajoutés au milieu d'incubation. Cette observation indique que les enzymes protéolytiques élaborées au sein du tissu coecal et sécrétées dans la lumière de l'intestin sont susceptibles d'être activées par des enzymes analogues à l'entérokinase des mammifères.

Les enzymes protéolytiques libérés dans la lumière de l'intestin y trouvent des conditions de pH favorables. Toutefois, si l'on se réfère aux valeurs de pH mesurées aux différents niveaux du tube digestif, on constate que le pH de l'intestin postérieur est plus proche du pH optimal d'activité de ces enzymes. Ce résultat signifie qu'une hydrolyse plus importante pourrait avoir lieu à ce niveau. En ce qui concerne les conditions de fonctionnement de l'amylase, également déversée dans la lumière de l'intestin par les coeca pyloriques, le pH intraluminal de la partie antérieure de l'intestin permettrait une meilleure hydrolyse des sucres que celui de la partie postérieure où le pH plus alcalin s'éloigne de l'optimum d'activité de l'amylase, caractérisé à pH 7.

L'hydrolyse des protéines et des glucides est complétée chez le loup par des enzymes intestinales. Nous en avons caractérisé deux qui hydrolysent des petits peptides : la leucine amino peptidase (LAP) et la glycylglycinedipeptidase (GGDP) et trois autres qui hydrolysent des disaccharidases : la maltase, la tréhalase et la sucrase.

L'optimum de pH nécessaire au fonctionnement de ces enzymes est le plus souvent situé en zone légèrement alcaline, à l'exception de la maltase pour laquelle un pH plus acide semble requis. Néanmoins, comme pour les endopeptidases (trypsine, chymotrypsine, carboxypeptidases) et l'amylase, ces valeurs sont compatibles avec celles du pH du fluide intestinal ou du milieu intracellulaire de l'intestin dont le pH est voisin de la neutralité dans la plupart des espèces.

En ce qui concerne les conditions thermiques de fonctionnement de ces enzymes, il semble que la température d'élevage de nos animaux (15°C) soit assez éloigné des températures optimales d'action de ces enzymes. Les effets de la température sur l'activité de ces enzymes ont été abordées succintement dans ce travail puisque nous avons mesuré cette activité que pour deux températures 25°C et 37°C. Néanmoins, nous avons constaté que la température la plus élevée stimulait de façon importante les activités enzymatiques. On en déduit que la température d'acclimatation des poissons (15°C) est probablement assez éloignée de la température optimale de fonctionnement de ces enzymes. Un phénomène analogue a d'ailleurs été très souvent constaté chez les poissons où il concerne non seulement les processus enzymatiques de la digestion mais également ceux de l'absorption intestinale.

La LAP, la GGDP et les disaccharidases étudiées sont généralement plus abondantes dans l'intestin que dans les coeca pyloriques. Cette observation démontre qu'il existerait chez le loup une spécialisation fonctionnelle des différentes parties du tube digestif en ce qui concerne l'hydrolyse des nutriments protéiques et glucidiques. Une telle situation parait favorable à une hydrolyse plus complète des protéines et des glucides dont l'étape ultime pourrait être effectuée par des enzymes intestinales comme chez les mammifères et chez certaines autres espèces de poissons. Toutefois, il est difficile de savoir si, comme chez les mammifères, ces enzymes de la dégradation ultime des glucides ou des protéines sont présentes exclusivement dans l'intestin ou si elles sont déversées ultérieurement dans la lumière. Chez les vertébrés, la plupart de ces enzymes sont incluses dans la matrice protéolipidique constitutive des parois membranaires des entérocytes qu'elles ne franchissent qu'exceptionnellement. Chez le loup, les recherches destinées à préciser la localisation de ces enzymes, n'ont pas encore été réalisées. Toutefois, chez une autre espèce la petite roussette, Crane et coll.(1979) ont pu apporter des preuves que certaines d'entre elles, notamment la maltase et la LAP, présentent la même localisation que chez les mammifères.

En ce qui concerne la localisation de la dernière des enzymes que nous avons dosée ; la phosphatase alcaline, on peut admettre qu'il s'agit d'une enzyme membranaire de la bordure en brosse des entérocytes, car, dans l'intestin de la plupart des espèces animales, on la trouve à ce niveau, notamment chez les poissons (Crane et coll 1979, Bogé et Rigal : observations personnelles). Le rôle de la phosphatase alcaline non spécifique dans les processus digestifs parait moins essentiel que celui des autres enzymes précédemment cités. Par contre, elle pourrait intervenir au cours des processus d'acclimatation des poissons à des milieux de salinité différents ainsi que Oide (1970) l'a observé

che l'anguille (Anguilla Japonica). L'étude de cette enzyme ainsi que l'Atpase NaK dépendante qui joue un grand rôle au cours de l'adaptation à la salinité, présenterait un grand intérêt chez le loup qui est une espèce supportant des milieux de salinité très différents.

CONCLUSIONS

Au cours de ce travail, nous avons effectué une étude des processus enzymatiques de la digestion intestinale chez les poissons, plus particulièrement axée sur trois grands groupes d'enzymes : les enzymes protéolytiques, les enzymes glucidolytiques et les enzymes hydrolysant les esters phosphoriques (la phosphatase alcaline non spécifique).

La première partie est consacrée à une revue bibliographique concernant la nature, l'origine et le mode d'action de ces différents groupes d'enzymes chez les poissons. Les nombreux travaux effectués montrent qu'il existe des variations dues à l'espèce, au régime alimentaire et aux divers paramètres physico-chimiques

La seconde partie présente les résultats que nous avons obtenus en recherchant quelques unes des activités enzymatiques intervenant dans l'hydrolyse des protéines, des glucides et des esters phosphoriques, ceci chez une espèce marine d'un grand intérêt économique : le loup (Dicentrarchus Labrax L.) . Nous avons tout d'abord mis en évidence une activité protéolytique particulièrement abondante dans les coeca pyloriques où elle présente un optimum d'activité à pH 9,0. Les coeca pyloriques sont également riches en une autre enzyme responsable de l'hydrolyse des glucides : l'amylase dont l'optimum de pH se situe à pH 7,0. L'activité d'une aminopeptidase la leucine aminopeptidase (LAP) a été également mise en évidence. Elle est plus active dans l'intestin que dans les coeca pyloriques, avec un optimum de pH situé entre 8,0 et 8,5. Une dipeptidase, la glycylglycinedipeptidase, susceptible d'hydrolyser une dipeptide simple la glycylglycine a également été identifié dans l'intestin. Cette enzyme est particulièrement active à pH 7,8. Enfin, plusieurs enzymes hydrolysant de façon spécifique le maltose, le tréhalose et le sucrose ont été mises en évidence, la maltase est plus active que la tréhalase et la sucrase, surtout à pH 6,2. Nous avons également caractérisé au niveau de l'intestin, mais aussi dans les coeca pyloriques, un groupe d'enzymes susceptible d'hydrolyser les esters phosphoriques en pH alcalin : la phosphatase alcaline non spécifique dont l'activité optimale se situe à pH 10,0. La plupart de ces activités enzymatiques sont sensibles à une élévation de température.

Cette étude des principales enzymes de la digestion intestinale du loup adulte peut servir de support à des recherches ultérieures sur la digestibilité des divers aliments susceptibles d'être ingérés par l'animal. En effet, si l'élevage du loup est aujourd'hui bien maitrisé, ce poisson reste encore un médiocre transformateur de nourriture. Une meilleure connaissance de la physiologie de la digestion chez ce poisson peut alors contribuer à améliorer la croissance de cet animal.

Vu : Le Professeur de l'Ecole Vétérinaire
rapporteur

Professeur RUCKEBUSCH

Vu : Le Directeur de l'Ecole Vétérinaire

Professeur R. LAUTIE

Vu : Le Président de la Thèse

Professeur BESSOU

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Toulouse, le 10 [illegible]
P/ LE PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
PAUL SABATIER, et par délégation
LE VICE-PRESIDENT,

Professeur [illegible]

BIBLIOGRAPHIE

AL HUSSAINI (A.H.).- Alkaline phosphatase in fish gut.
Nature (London) 1948 , 161 : 247.

AL HUSSAINI (A.H.).- On the functional morphology of the alimentary tract of some fish in relation to differences in their feedings habits.
Quart. J. Microscop. Sci., 1949, 90 : 109-139.

ALLIOT (E.), FEBVRE (A.) et METAILLER (R.).- Les protéases digestives chez un téléostéen carnivore : Dicentrarchus Labrax L.
Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys., 1974, 14 (2) : 229-237.

ALLIOT (E.), PASTOUREAUD (A.) et TRELLU (J.).- Evolution des activités enzymatiques dans le tube digestif au cours de la vie larvaire du Bar (Dicentrarchus Labrax L.). Variations des protéinogrammes et des zymogrammes.
1977.

ALMY (L.H.).- cité par CREAC'H (1963).
J. Amer. Chem. Soc., 1926, 48 : 2136-46.

ANANICHEV (A.V.).- cité par CREAC'H (1963).
Biokhimija , 1959 , 24 : 1033-1040.

ASH (R.).- The hydrolysis of dipeptides by mucosa from different regions of the alimentary tract of the brown trout. (Salmo truitta) .
Proc. Nutr. Soc., 1979, 38 A.16.

ASH (R.).- Hydrolytic capacity of the trout (Salmo gaindneri)intestinal mucosa with respect to three specific dipeptides.
Comp. Biochem. Physiol., 1980, 65 B : 173-176.

BABKIN (B.P.) et BOWIE (D.).- cité par CREAC'H (1963).
Biol. Bull., 1928, 54 : 254-277.

BABKIN (B.P.).- cité par CREAC'H (1963) et YAMAME (1972).
Biol. Bull., 1929, 57 : 272-291.

BARNABE (G.).- Contribution à la connaissance de la biologie du loup (Dicentrarchus Labrax L.).
Thèse de doctorat d'état. Université des Sciences et Techniques du Languedoc, 1976 : 228 p.

BARRINGTON (E.J.M.).- The alimentary canal and digestion.
in " the Physiology of fisches ", 1957, 1 : 109-161.
(édité par Brown M.E.). Academic Press - New-York.

BATTLE (H.I.).- cité par BERNARD (1952)
J. Biol. Bd .Canada, 1935, 1 : 145-157.

BEAUVALET .- cité par CREAC'H.(1963) et YAMANE (1972).
C.R. Acad. Sci., 1933, 196 : 1437-1439.

BAYLISS (L.E.).- cité par CREAC'H (1963) et YAMANE (1972).
J. Marine Biol. Assoc.U.K., 1935, 20 : 73-91.

BERGMEYER (H.V.).- Méthods of enzymatic analysis.
Academic Press. New-York et London. 1965

BERNARD (F.).- La digestion chez les poissons.
Trav. Lab. Hydrob. Pisciculture. Univ. Grenoble, 1952, 44 :61-95.

BERTIN (L.).- Appareil digestif.
Dans " traité de zoologie - Agnathes et Poissons ".
1958, 2 : 1249-1302 (Edité par Grassé P.P.) Masson - Paris.

BOGE (G.), RIGAL (A) et PERES (G.).-Rates of in vivo intestinal absorption of glycine and glycylglycine by rainbow trout (Salmo gaindneri).
Comp. Biochem. Physiol., (sous presse - Communication personnelle)

BODANSKY (M.) et ROSE (W).-cité par BERNARD (1952).
Amer J. Physiology , 1922, 62 : 483-487.

BONDOUY (C.R.).- cité par BERNARD (1952)
Soc. Biol., 1899, 51 : 453.

CRANE (R.K.), BOGE (G.) et RIGAL (A.).- Isolation of brush border membranes in vesicular form from the intestinal spiral valve of the small dog-fish (Scyliorhinus canicula).
Biochim. Biophys. Acta, 1979, 554 : 264-267.

CHESLEY (L.C.).- cité par BERNARD (1952).
Biol. Bull., 1934, 66 : 134-144.

COHNHEIM (O.).- cité par CREAC'H (1963).
Zeitsch. Physiol. Chem., 1909, 59 : 239.

COOKE (N.E.) et CHOWDHURY (N.K.).- cité par CREAC'H (1963).
Fish. Res. Bd. Canada, Progress. Rept. Pacific Coast Sta, 1948, 75 : 51-54.

CREAC'H (P.V.).- Les enzymes protéolytiques des poissons;
Ann. Nutr. Alim., 1963, 17 : 375-471.

COURTOIS (J.E.) et PERLES (R.).- Les enzymes.
Dans " Précis de chimie biologique ", 1964, tome 1 : 1-82.
Masson- Paris.

CROSTON (C.B.).- Tryptic enzymes of Chinock Salmon.
Arch. Biochem. Biophys., 1960, 89 : 202-206.

DAHLQUIST.- Anal. Biochem., 1964, 7 : 18.

EDINGER (L.).- cité par BERNARD (1952).
Arch. F. Mikrosc Anat.2., 1877.

EICHLOLTZ (A.).- Structural and functional organization of the brush border in intestinal epithelial cells. III.- Enzymes activities and chemical composition of various fractions of Tris-disrupted brush borders.
Biochim. Biophys. Acta, 1967, 135 : 475-483.

FEHLMANN (J.W.).- cité par BERNARD (1952).
Zeitsch j. Fish., 1915, 1 : 62.

FISH (G.R.).- cité par YAMANE (1972).
Hydrobiologia, 1960, 15 : 161-178.

FUJII (M.), HIROSE (H.) et ERA (S.).- cité par CREAC'H (1963).
Bull. Japan. Soc. Sci. Fisheries , 1951, 16 , (12) : 37-39.

GAS (N.).- Cytophysiologie de l'appareil digestif et du tissu musculaire de la carpe. Modifications structurales et fonctionnelles induites par le jeûne et la réalimentation.
Thèse de doctorat es-sciences. Toulouse - France, 1978.

GHANEKAR (D.S.) et BAL (D.V.).- cité par CREAC'H (1963).
Indian J. Fish., 1955, 2 : 349-359.

GOEL, KRISHAM (A.) et SASTRY (V.K.).- cité par SINHA (1978).
Acta histochem., 1973, 47 : 8-14.

GOLBARG (J.A.) et RUTENBERG (A.M.).- The colorimétric determination of leucine aminopeptidase in urine and serum of normal subjects and patients with cancer and other diseases.
Cancer, 1958, 11 : 283.

GRASSMANN (W.) et HEYDE (W.).- Hoppe Seylers Z.
Physiol. Chem., 1930, 188 : 69.
(cité par Wust. (1965)).

HUGGETT (A.) et NIXON (D.A.).- Enzymatic determination on lymph glucose in rats.
Lancet, 1957, 2 : 386-390.

HYKES (O.V.), MAZANEC (J.) et SZECSENYI (L.).- cité par CREAC'H (1963).
Compt. Rend. Soc. Biol., 1934, 117 : 166-168.

ISHIDA (J.).- The stomach of Mugil cephalus and its digestive enzymes.
An. Zool. Jap., 1935, 15 : 182.

ISHIDA (J.).- Distribution of the digestive enzymes in the digestive system of stomachless fisches.
Ibid, 1936, 15 : 263.

JACOBSHAGEN (E.).- cité par BERNARD (1952).
in " Bölk-Goppert, Handbuch der vergleich, Anat der Wirbeltiere Berlin - 1937- tome III.

JANCARIK (A.).- cité par YAMANE (1972.
Z. Fish, 1964, 12 : 601-684.

JOHNSTON (W.W.).- cité par CREAC'H (1963).
Journ. Biol. Bd. Canada, 1937, 3 : 473-485.

JOHNSTON (W.W.).- cité par CREAC'H (1963).
J. Fish. Res. Bd. Canada, 1941, 5 : 217-226.

KASHIWADA (K.).- cité par CREAC'H (1963).
Japan Soc. Scient. Fisheries, 1952, 18 : 151-154.

KAWAI (S.I.) et IKEDA (S.).- Studies on digestive enzymes of fisches.
I.- Carbohydrates in digestives organs of several fisches.
Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 1971, 37 (4) : 333-337.

KAWAI (S.) et IKEDA (S.).- Studies on digestive enzymes of fisches .IV.- Developpement of the digestive enzymes of carp and black sea bream after Hatching.
Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 1972, 39 (8) : 877-881.

KENYON (W.A.).- Digestive enzymes in poikilothermal vertebrates.
Bull. Bur. Fish . Washington., 1925, 41 : 181.

KRUKENBERG (C.F.W.).- cité par CREAC'H. (1963).
Unters ans dem physiol Inst. Heidelberg, 1878, 1 : 327-340.

LEGOUIS (S.).- cité par BERNARD (1952).
Ann. Sci. Nat. Zool., 1853, 18 : 1-184.

LLOYD et WHELAN .- Anal. Biochem., 1969, 30 : 467.

LOUISOT (P.).- Enzymologie .
Dans biochimie métabolique, 1969, pp.3-78. SIMEP-Editions- LYON.

MAC-KAY (M.E.).- cité par CREAC'H (1963).
Biol. Bull., 1929, 56 : 8-23.

MOORE (S.) et STEIN (W.H.).- Procedures for the chromatographie determination of aminoacids on four per cent cross linked sulfonated polystyrene resins.
J. Biol. Chem., 1954, 211 : 893-906.

MAGASE (G.).- cité par YAMANE (1972).
Z. Vergl. Physiol., 1964, 49 : 270-284.

NILSSON (A.) et FANGE (R.).- Digestive proteases in the holocephalian fish : Chimaea monstruosa L.
Comp. Biochem. Physiol., 1969, 31 : 147-165.

NILSSON (A.) et FANGE (R.).- Digestive proteases in the cyclostome : Myxine glutinosa L.
Comp. Biochem. Physiol., 1970, 32 : 237-250.

OIDE (M.).- Purification and some properties of Alcaline phosphatase from intestinal mucosa of the eel adapted to fresch water or sea water
Comp. Biochem. Physiol., 1970, 36 : 241-252.

OIDE (M.).- Rôle of Alcaline phosphatase in intestinal water absorption by eels adapted to sea water.
Comp. Biochem. Physiol., 1973, 46 A : 639-645.

OOSHIRO (Z.).- Studies on proteinase in pyloric coeca of fishes.
II.- Some properties of proteinase purified from the pyloric coeca of mackerel.
Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 1971, 37 : 145-148.

OYA (T.) , KAWAKAMI (M.) et SUZUKI (S.).- cité par CREAC'H (1963).
J. Imp. Fish. Inst. Japan, 1927, 22 : 105.

PHILLIPS (A.M.).- Nutrition digestion and energy utilization.
in " Fish physiology ", 1969, vol.1, Excretion ionic regulation and metabolism (édité par HOAR W.S. et RANDALL (D.J.)).
Academic Press New-York et London.

POLIMANTI (O.).- cité par CREAC'H (1963).
Biochem. Zeitsch, 1912, 38 : 113-134.

PRAKASH (A.).- Distribution and differenciation of Alcaline phosphatase in the gastro-intestinal tract of Steelhead trout.
J. exp. Zool., 1961, 146 (3) : 237-252.

RICK .- Measurement of enzyme activity : Trypsin. Determination with haemaglobin as substrate. In " methods of enzymatic analysis ". 1965, pp. 808-811. Edited by H.V. Bergmeyer. Academic Press. New-York et London.

SARBAHI (D.S.).- cité par YAMANE (1972). Biol. Bulletin, 1951, 100 : 244-257.

SCHLOTTKE (E.).- cité par CREAC'H (1963). Sitzber - Abhandl- Naturforsch. GES. Rostock, 1938-1939, 7 27-88.

SCHLOTTKE (E.).- Untersuchungen über die Verdanungsfermente der Quappe (Lota vulgaris). Zeitsh. F. Fisherei, 1939, 37 : 381.

SCHLOTTKE (E.).- Untersuchungen über die verdanungsfermente des Flussbarshes (Perca fluviatilis) Zeitsh.F. Fisherei, 1940, 38 : 1

SCHLOTTKE (E.).- Untersuchungen über die verdanungsfermente der Regenbogenforelle (Trutta iridea). Zeitsh.F. Fisherei., 1941, 38 : 33.

SCHLOTTKE (E.).- Untersuchungen über die Verdenungsfermente in Karpfendarm und ihre Anderung während des Sommers. Zeitsh F. Fisherei, 1941, 38 : 323.

SHAFFI (S.A.), JAFRI (A.K.) et KHAWAJA (D.K.).- cité par SINHA (1978). Broteria Ser. Trimest Cienc Chem., 1974, 43 : 39-44.

SINHA (G.M.).- Histochemical localization of Alkaline and Acid phosphatases in the alimentary tract of H stchling of a Teleast fish : Cirrhinus mrigala. Mikroskopie, 1979, 35 : 101-107.

SMITH (E.L.), CARTWRIGHT (G.E.), TYLER (F.H.) et WINTROBE (M.M.).- J. Biol. Chem., 1950, 185 : 59 Cité par WUST (1965.

SIVADAS (P.) et GOVINDAN(P)- cité par SINHA (1978).
J. Anim. Morph. Physiol., 1970, 17 : 131-136.

SRIVASTAVA (A.K.).- cité par SINHA (1978).
Curr. Sci., 1966, 35 : 154-155.

STERN (J.A.) et LOCKHART (E.E.).- cité par CREAC'H (1963).
J. Fish. Res. Bd. Canada, 1953, 10 : 590-598.

STREET (H.V.).- Measurement of enzyme activity : Amylase.
in " Methods of enzymatic analysis ", 1965 : 854-858.
Edited by H.V. Bergmeyer - Academic Press. New-York et London.

SULLIVAN (M.X.).- cité par CREAC'H (1963).
Bull.U.S. Bureau od fisheries, 1908, 27 : 1-27.

TANAKA (M.).- Studies on the structure and function of the digestive system and changes in activities of digestive enzymes during larval and juvenile stages in Ayu.
Bull. Jap. Soc. Sci. Fish, 1972, 38 (10) : 1143-1152.

TOGAZAWA (Y.) et KATSUMATA (T.).- cité par CREAC'H (1963).
Bull. Japan. Soc. Scientif. Fish., 1956, 21 : 1070-1075.

TOGASAWA (Y.) et KATSUMATA .- cité par CREAC'H (1963.)
Bull. Japan Soc. Scientif. Fish., 1957-1958, 23 : 157-162.

VONK (H.I.).- The specificity and collaboration of digestive enzymes in Metazoa.
Biol. Rev., 1937, 12 : 215.

WUST (H.I.).- Measurement of enzyme activity : Peptidases. A acidimetric determination of di and polypeptidases.
In " Méthods of enzymatic analysis ", 1965 : 824-826.
Edited by H.V. Bergmeyer - Academic Press. New-York et London.

YAMANE (S.).- Localization of amylase activity in the digestive organs of carps determined by a starch substrate film method.
Bull. Jap. Soc. Sci. Fish, 1972, 39 (5) : 497-504.

YAMANE (S.).- Localization of amylase activity in the digestive organs of the mozambique, mouth brooder, Tilapia mozambica, and bluegill. Leponis macrochinus determined by a starch substrate film method.
Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 1972, 39 (6) : 595-603.

YONGE .- Evolution and adaptation in the digestive systems of the Metazoa.
Biol. Rev, 1937, 12 : 87-115.

ZENDZIAN (E.N.) et BERNARD (E.A.).- Distribution of pancreatic ribonuclease chymotrypsin and trypsin in vertebrates.
Arch. Biochem. Biophys., 1967, 122 : 699-713.